

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abt. für Neuopharmakologie

Beeinflussung der Acetylcholinfreisetzung aus isoliert perfundierten Hühnerherzen durch inhibitorische Muskarinrezeptoren und excitatorische Nikotinrezeptoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Claudia Krieg
aus Heidelberg

Mainz 1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554402_0030

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abt. für Neuropharmakologie

**Beeinflussung der
Acetylcholinfreisetzung aus isoliert
perfundierten Hühnerherzen durch
inhibitorische Muskarinrezeptoren
und excitatorische Nikotinrezeptoren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Claudia Krieg
aus Heidelberg

Mainz 1981

Aus dem Protokoll der Sitzung
des Senats der Universität
am 10. April 1981

Bestimmung der

Acetylcholinesterase-Aktivität
bei Patienten mit Myasthenia
gravis durch
inhibitorische Muskeltestungen
und evokede Muskeltestungen

- Dekan: Professor Dr. med. H. Leithoff
1. Gutachter: Professor Dr. med. H. Kilbinger
2. Gutachter: Professor Dr. med. E. Muscholl

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 1981



Abgefragt von
Prof. Dr. H. Kilbinger
am 10. April 1981

INHALT

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODE	5
1. Material	5
a) Versuchstiere	5
b) Perfusionslösungen	5
c) verwendete Substanzen	5
2. Methode	6
a) Präparation	6
b) Versuchsaapparatur	6
c) Acetylcholinbestimmung	8
d) Versuchsschema	10
e) statistische Auswertung	11
III. ERGEBNISSE	12
A. Vagusstimulation mit Stromimpulsen	12
1. Kontrollversuche	12
a) ohne Cholinesterasehemmung	12
b) mit Cholinesterasehemmung	13
c) vergleichende Zusammenfassung der Kontrollversuche	14
2. Einfluß von Atropin auf die Acetylcholinfreisetzung	16
a) ohne Cholinesterasehemmung	16
b) mit Cholinesterasehemmung	18
c) Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während 5 Minuten Vagusstimulation mit 3 Hz	19
d) vergleichende Zusammenfassung der Effekte von Atropin $10^{-6}M$ auf die Acetylcholinfreisetzung	21
3. Änderungen der Herzschlagfrequenz durch Acetylcholin, Eserin und Atropin	23
4. Oxotremorin-Atropin-Antagonismus	28

	Seite
5. Einfluß von Oxotremorin auf die Acetylcholin- freisetzung	30
a) mit Cholinesterasehemmung	30
b) ohne Cholinesterasehemmung	30
c) Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während 5 Minuten Vagusstimulation mit 3 Hz	30
6. Senkung der Herzfrequenz durch Oxotremorin	33
B. Vagusstimulation mit DMPP	34
7. DMPP-Dosis-Effekt-Beziehung	35
8. Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während Perfusion mit DMPP	37
9. Hemmung der durch Stimulation mit 3 Hz hervor- gerufenen Acetylcholinfreisetzung nach Perfusion mit DMPP	39
10.a) Hemmung der durch DMPP hervorgerufenen Acetyl- cholinfreisetzung durch TTX	41
b) TTX-Wirkung auf die durch K^+108mM hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung	42
11. Hemmung der Acetylcholinfreisetzung durch (+)-Tubocurarin	44
12. Änderungen der Herzschlagfrequenz durch K^+108mM , TTX und (+)-Tubocurarin	45
13. Einfluß von Atropin auf die durch DMPP hervorge- rufene Acetylcholinfreisetzung	46
a) ohne Cholinesterasehemmung DMPP-Kontrollversuche Einfluß von Atropin $10^{-6}M$	47
b) mit Cholinesterasehemmung DMPP-Kontrollversuche Einfluß von Atropin $10^{-6}M$	49
14. Änderungen der Herzschlagfrequenz durch DMPP	50
a) ohne Cholinesterasehemmung	50
b) mit Cholinesterasehemmung	52

	Seite
IV. DISKUSSION	56
1. Excitatorische Nikotinrezeptoren	56
2. Kein Anhalt für excitatorische Muskarinrezeptoren in den parasympathischen Ganglien des Hühnerherzens	60
3. Änderungen der Herzfrequenz durch Beeinflussung postsynaptischer Muskarinrezeptoren	61
4. Inhibitorische Muskarinrezeptoren als Bestandteil des Nervus vagus	65
a) Oxotremorin-Atropin-Antagonismus	65
b) Einfluß des Cholinesterasehemmstoffs Eserin auf die Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin	67
c) Lokalisation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren	73
V. ZUSAMMENFASSUNG	77
VI. LITERATUR	79
VII. LEBENSLAUF	84

I. EINLEITUNG

Die ganglionäre Impulsübertragung erfolgt sowohl im sympathischen als auch im parasympathischen Anteil des vegetativen Nervensystems cholinerg. Der Neurotransmitter Acetylcholin tritt nach seiner Freisetzung aus der präganglionären Nervenfasern mit Acetylcholinrezeptoren der postganglionären Nervenfasern in Kontakt, wodurch eine Depolarisation der postganglionären Zellmembran und eine Fortleitung des Aktionspotentials durch das zweite Neuron zum Erfolgsorgan erfolgen kann.

Seit etwa 30 Jahren kennt man aufgrund verschiedener Untersuchungen an sympathischen Ganglien neben den Nikotinrezeptoren, an denen die ganglienstimulierenden Effekte des Acetylcholins durch Nikotin und nikotinähnliche Substanzen nachgeahmt werden können, Muskarinrezeptoren, welche durch Acetylcholin und muskarinartige Substanzen stimulierbar sind. Die Muskarinrezeptoren sind im Gegensatz zu den Nikotinrezeptoren durch kleine Mengen Atropin blockierbar. (Literatur bei TRENDELENBURG, 1967)

Messungen der ganglionären Potentialschwankungen und der Nervenaktionspotentiale ergaben, daß die ganglionären Nikotinrezeptoren von den Muskarinrezeptoren auch elektrophysiologisch gut unterschieden werden können (TAKESHIGE und VOLLE, 1964). Mit Hilfe der Elektrophysiologie war es möglich, z.B. für den Bau und die Funktion des Ganglion cervicale superius von Säugetieren ein gut fundiertes Modell zu entwickeln (VOLLE und KOELLE, 1975).

Inwieweit die an sympathischen Ganglien gewonnenen Ergebnisse auf das parasympathische Nervensystem übertragbar sind, ist noch nicht geklärt.

An cholinergen Synapsen des Zentralnervensystems wurde mehrfach beobachtet, daß die Muskarinantagonisten Atropin und Scopolamin die Acetylcholinfreisetzung steigern (Übersicht bei PEPEU, 1973).

POLAK (1971) beobachtete, daß die durch Atropin bewirkte Steigerung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung aus der Rattenhirnrinde von den Muskarinagonisten Oxotremorin und Methacholin antagonisiert wird und leitete aus diesen Ergebnissen die These eines negativen Feedback-Mechanismus ab. Diese beinhaltet, daß das Acetylcholin, welches von cholinergen Synapsen des Zentralnervensystems freigesetzt wird, präsynaptische inhibitorische Muskarinrezeptoren stimuliert und damit die weitere Freisetzung hemmt. Dieser Effekt ist durch Muskarinagonisten imitierbar und durch Muskarinantagonisten blockierbar.

Die durch elektrische Stimulation postganglionärer Sympathikusfasern hervorgerufene Noradrenalinfreisetzung aus Kaninchenherzen wird durch Acetylcholin und verschiedene Muskarinagonisten gehemmt. Die Hemmung wird durch Atropin aufgehoben (FOZARD und MUSCHOLL, 1972). An verschiedenen Organen unterschiedlicher Tierspezies konnte nachgewiesen werden, daß die postganglionären sympathischen Nervenfasern mit wahrscheinlich präsynaptisch lokalisierten inhibitorischen Muskarinrezeptoren ausgestattet sind (Übersicht bei MUSCHOLL, 1979).

Beeinflussung der Acetylcholinfreisetzung aus peripheren cholinergen Neuronen durch inhibitorische Muskarinrezeptoren wurde am Meerschweinchenileum beobachtet. Die durch elektrische Feldreizung hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung aus dem Auerbachschen Plexus des Meerschweinchens wird durch den Muskarinagonisten Oxotremorin vermindert und durch Atropin gesteigert. Werden Darmmuskelstreifen mit Oxotremorin $10^{-4}M$ und Atropin $10^{-6}M$ gleichzeitig inkubiert, so ist die durch Feldreizung mit 0,3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung nicht signifikant verschieden von den Kontrollwerten ohne eine dieser Substanzen (KILBINGER, 1977).

Die Untersuchungen am Meerschweinchenileum wurden, wie fast alle Experimente an isolierten Organen, bei denen eine quantitative Messung der Acetylcholinfreisetzung erfolgte, unter Verwendung eines Cholinesterasehemmstoffes durchgeführt.

Denn ohne Hemmung der Cholinesterase wird das von cholinergen Neuronen freigesetzte Acetylcholin im allgemeinen so schnell hydrolysiert, daß es in der entsprechenden Inkubationslösung oder Perfusionslösung kaum noch meßbar ist.

Die Verwendung von Cholinesterasehemmstoffen birgt aber den Nachteil in sich, daß die unphysiologisch hohe Acetylcholin-konzentration in Rezeptor-Nähe selbst auf die weitere Acetylcholinfreisetzung Einfluß nehmen kann.

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Cholin konnte nachgewiesen werden, daß unter Einfluß des Cholinesterasehemmstoffes Eserin die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung aus der Rattenhirnrinde (SZERB und SOMOGYI, 1973) und aus dem Auerbachschen Plexus des Meerschweinchens (KILBINGER und WESSLER, 1980) deutlich vermindert ist. Außerdem wurden für Cholinesterasehemmstoffe verschiedene Eigenwirkungen diskutiert: Verstärkung ganglionärer Effekte muskarinartiger Substanzen, direkt hemmende Wirkungen, direkt stimulierende Wirkungen (TRENDELENBURG, 1967).

Daher schien es erstrebenswert, ein Organ zu finden, an dem man die Acetylcholinfreisetzung quantitativ messen kann, ohne die Cholinesterase des Versuchsorgans hemmen zu müssen.

Das isoliert perfundierte Hühnerherz bietet diesen Vorteil. Auch ohne Cholinesterasehemmung ist die Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen als Antwort auf elektrische Vagusstimulation gaschromatographisch leicht quantitativ meßbar (KILBINGER und LÖFFELHOLZ, 1976).

Folgende Fragen sollten mit Hilfe der Experimente am Hühnerherzen beantwortet werden:

Wie wirkt Atropin auf die Acetylcholinfreisetzung und die Schlagfrequenz der Hühnerherzen?

Beeinflußt der Cholinesterasehemmstoff Eserin die Atropin-Effekte?

Lassen sich Anhaltspunkte finden, daß auch die Acetylcholin-freisetzung aus den peripheren parasymphatischen Nerven des Hühnerherzens durch inhibitorische Muskarinrezeptoren steuerbar ist?

Können die Acetylcholinrezeptoren im Nervus vagus des Hühnerherzens genauer lokalisiert werden?

II. MATERIAL UND METHODE

1. Material

- a) Als Versuchstiere dienten weiße Junghennen im Alter von 14 bis 24 Wochen. Die Untersuchungen wurden an den isolierten Herz-Nerv-Präparaten vorgenommen. Die Herzen wogen - nach dem Versuch zwischen Filterpapier getrocknet - 2,7 bis 4,2 g.
- b) Die benötigten Perfusionslösungen wurden an jedem Versuchstag frisch hergestellt. Die Tyrodelösung wurde aus 3 Stammlösungen gemischt unter Zugabe von Aqua dest., Glucose und Cholin.

1 l gebrauchsfertige Tyrodelösung enthielt:

NaCl	8,0 g	=	137 mM
KCl	0,2 g		2,7 mM
CaCl ₂	0,2 g		1,8 mM
MgCl ₂	0,1 g		1,0 mM
NaHCO ₃	1,0 g		11,9 mM
NaH ₂ PO ₄	0,05 g		0,4 mM
Glucose	1,0 g		5,6 mM
Cholinchlorid	1,4 mg		0,01 mM

Die in 3 Versuchen verwendete kaliumreiche Tyrodelösung enthielt die 40-fache K^+ -Konzentration (K^+ 108 mM/l). Na^+ wurde äquimolar reduziert (44 mM/l).

- c) Alle verwendeten Substanzen, die auf das Hühnerherz einwirken sollten, waren wasserlöslich und wurden der jeweiligen Tyrodelösung beigemischt.

Eserinsulfat (Boehringer Sohn, Ingelheim)

Atropinsulfat (Boehringer Sohn, Ingelheim)

Oxotremorin sesquifumarat (Aldrich Chemical Company)

1,1 Dimethyl-4-phenylpiperaziniumjodid (Fluka-AG)

(+)-Tubocurarinchlorid Pentahydrat (Fluka-AG)

Tetrodotoxin (Sankyo)

2. Methode

a) Präparation

Das Versuchstier wurde durch Genickschlag getötet und nach Abtrennen des Kopfes entblutet. Mit wenigen schnellen Schnitten wurde der Thorax eröffnet und das Perikard entfernt. In den schnell freipräparierten Arcus aortae wurde eine luftblasenfrei mit Tyrodelösung gefüllte Kanüle eingebunden. Die Kanülenspitze lag ca. 1 cm hinter der Aortenklappe, um diese keinesfalls zu durchstoßen. Auf diese Weise wurden durch den retrograden Zufluß über die Aorta die Koronarien perfundiert. Die Perfusion erfolgte während der ganzen Präparation mit carbogenbegaster (95 % O_2 , 5 % CO_2), vorgewärmter Tyrodelösung der beschriebenen Zusammensetzung bei einer konstanten Durchflußrate von 20 ml/min. Alle anderen herznahen Gefäße wurden durchtrennt, um Abflußstauungen zu vermeiden. Während das Herz spontan leer weiterschlug, wurden die beiden Nervi vagi ganz sorgfältig freipräpariert und ca. 3 cm kranial vom Herzen in dünne Bindfäden eingebunden. Die Präparation dauerte 25 Min. Während dieser Zeit wurden die Nerven stets mit Tyrodelösung befeuchtet. Jeder Zug an den Nerven, der eine Beschädigung der feinen Faserenden bewirken könnte, wurde vermieden.

Das Herz mit den Nervi vagi wurde dann vorsichtig aus dem Tierkörper gelöst, und das so gewonnene Versuchspräparat wurde über die Kanüle direkt an die Langendorff-Apparatur angeschlossen.

b) Versuchsapparatur

Die Perfusionsapparatur bestand aus zwei doppelwandigen Glasröhren. Die Innenröhren konnten aus höher stehenden Vorratsgefäßen mit verschiedenen Tyrodelösungen gespeist werden. Der Raum zwischen Innenröhre und äußerem Mantel wurde durch einen Umlaufthermostaten mit warmem Wasser durchströmt. Dadurch wurden die Tyrodelösungen konstant durchwärmt. Alle Versuche wurden mit gleichwarmer Tyrode-

lösung durchgeführt, so daß die Temperatur an der Herzspitze konstant 37°C betrug. Am unteren Ende der Röhren wurde über feinmaschige Fritten Carbogen aus Gasleitungen zugeführt, das die Perfusionslösungen durchperlte. Durch einen 4-Wege-Hahn konnte wahlweise eine der beiden erwärmten, carbogenisierten Tyrodelösungen dem Herzen zugeleitet werden, und zugleich konnte der Inhalt der anderen Röhre nach außen abfließen.

Die Zuleitung der Perfusionslösung zum Herzen erfolgte durch einen Gummischlauch, welcher unter einer Rollpumpe zu der Kanüle führte, an der das Versuchspräparat hing. Die Rollpumpe (Desaga, Heidelberg) war bei jedem Versuch so eingestellt, daß sie konstant 20 ml/min retrograd in die Aorta förderte. Die Durchflußrate wurde an jedem Herzen vor Reizbeginn überprüft. Da durch den Druck der Perfusionslösung die Aortenklappe geschlossen blieb, floß die Tyrodelösung orthograd ausschließlich durch die Koronargefäße.

Die beiden Nervi vagi wurden nebeneinander durch Platinringelektroden gelegt, die von gewärmter Tyrodelösung gleichmäßig befeuchtet wurden. So wurde verhindert, daß durch Austrocknen der Nerven oder durch Temperaturunterschiede das Ergebnis der Reizung verfälscht wurde. Die Nervenreizung erfolgte durch einen Grass S 9-Stimulator mit einer Reizfrequenz von 20 Hz oder 3 Hz.

Ein verstellbarer Widerstand erlaubte, bei jedem Versuch die gleiche Stromstärke (15 mA) einzustellen. Der Stromfluß zwischen den beiden Platinringelektroden wurde konstant gehalten, was bei jeder Nervenreizung durch einen Oszillographen kontrolliert wurde.

Vorversuche zeigten, daß die Herzfrequenz-hemmende Wirkung einer elektrischen Reizung der Nervi vagi bei einer Stromstärke von 12 mA maximal war.

Zur Registrierung der Herzschlagfrequenz wurde ein Hellige Heloscriptor verwendet. Das Hühnerherz wurde mit 3 dünnen Bindfäden, die auf gleicher Höhe waagrecht gespannt wurden, fixiert. Beim Anbringen der Fäden wurde besonders darauf ge-

achtet, die Koronarien nicht zu beschädigen. 2 Stabilisierungsfäden führten von der Wand des linken Ventrikels zu einem festen Ständer, der dritte Faden war in der rechten Herzkammer befestigt und zur elektrischen Frequenzregistrierung mit dem DMS-Aufnehmer verbunden. Jedes Herz wurde mit der Kraft von 10 g eingespannt.

Durch die Fixation wurden Rotations- und Pendelbewegungen des Herzens verhindert, was nicht nur der exakten Frequenzregistrierung, sondern auch der ruhigen Lage der Nervi vagi in den Elektroden diente. Die Herzfrequenz wurde kontinuierlich registriert. Zu allen Zeitpunkten, die für die Frequenzauswertung interessant waren, wurde die Papiergeschwindigkeit 2,5 mm/sec gewählt, zwischendurch 0,1 mm/sec.

c) Acetylcholinbestimmung

Zur Acetylcholinbestimmung wurde das vom Herz heruntertropfende Perfusat in ein Zentrifugenglas aufgefangen, das Propionylcholin und Butyrylcholin (je 0,5 oder 1 nmol) als inneren Standard enthielt.

Vor und während Vagusreizung wurde jeweils eine Minute lang das Perfusat in einem Glas gesammelt.

Nur bei den Versuchen mit Dimethylphenylpiperazinium wurde in halbminütigen Abständen das Perfusat aufgefangen, um den veränderten Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung genauer zu erfassen. Das heißt, zur Acetylcholinbestimmung dienten Proben aus 10 oder 20 ml Tyrodelösung.

Bei 6 Proben wurde der Acetylcholingehalt kaliumreicher (K^+ 108 mM) Tyrodelösung bestimmt. In diesen Fällen wurden die Cholinester als Reineckatsalze gefällt, wie KILBINGER (1973) beschrieb.

Bei allen anderen Experimenten wurde der Acetylcholingehalt des gesammelten Perfusats durch folgende Aufarbeitung der Proben ermittelt (Methode KILBINGER, 1977): Die gesammelte Tyrodelösung wurde sofort mit einer Lösung von Dipikrylamin in Dichlormethan (1 mM) vermischt, in das die Cholinester durch 5-minütiges Schütteln extrahiert wurden.

Nach Zentrifugieren wurde die organische Phase in kleinere Zentrifugengläser pipettiert. Sie wurde durch Pressluft bis auf 1 ml abgeblasen und mit 1 ml eiskaltem Carbonat-Puffer (pH 9) 1 Min. lang gewaschen, um überschüssiges Dipikrylamin aus der Probe zu entfernen.

Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde die organische Phase in 1-ml-Gläser pipettiert und unter Pressluft eingetrocknet. In einem Vacuum-Exsiccator wurden die Proben danach noch mindestens 30 Min. über Phosphorpentoxid getrocknet. Die weitere Aufarbeitung erfolgte für alle Proben nach der von KILBINGER (1973) genau beschriebenen Methode. Die Cholinester wurden in Stickstoffmilieu demethyliert durch eine Mischung von Thiophenol in Aethylmethyl-Keton. Die entsprechenden tertiären Amine der Kontrollsubstanzen Butyrylcholin und Propionylcholin und des zu bestimmenden Acetylcholin wurden durch Mikrodestillation in gereinigtem Äther konzentriert. Die quantitative Bestimmung erfolgte in einem Hewlett-Packard 7620 Gaschromatographen mit Stickstoff-selektivem Detektor (beschrieben von KILBINGER, 1973).

Für jeden Versuch wurden 3 Eichproben hergestellt. Diese enthielten neben den inneren Standards Propionylcholin und Butyrylcholin bekannte Mengen Acetylcholin in Tyrodelösung, die an diesem Versuchstag hergestellt wurde. Die Eichproben wurden ohne Unterschied wie alle anderen Proben aufgearbeitet. Mit Hilfe der Eichproben wurde für jeden Versuch der Eichfaktor errechnet, der zur Korrektur der Versuchsergebnisse diente. Der gaschromatographisch bestimmte und durch Integration berechnete Acetylcholingehalt einer Probe wurde mit dem Eichfaktor multipliziert und durch das Herzgewicht dividiert. Die ermittelte absolute Acetylcholinfreisetzung ist daher in der Einheit (pmol/g x min) angegeben. Was in dieser Arbeit als "Acetylcholinfreisetzung" angegeben wird, entspricht dem gemessenen "overflow" aus dem Herzen.

d) Versuchsschema

Alle im folgenden Ergebnisteil beschriebenen Versuche mit elektrischer Vagusreizung sind unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt, um zuverlässige Vergleiche zu ermöglichen.

Die Messungen wurden erst begonnen, nachdem sich das Herz mindestens 15 Min. lang an die Perfusion an der Langendorff-Apparatur adaptiert hatte.

Der Zeitabstand zwischen zwei elektrischen Vagusreizungen betrug bei allen Versuchen konstant 20 Minuten.

Variiert wurden die Reizfrequenz (20 Hz oder 3 Hz) und der Zusatz von Eserin ($10^{-6}M$), Atropin ($10^{-8}M$, $10^{-7}M$, $10^{-6}M$) und Oxotremorin ($10^{-5}M$, $10^{-4}M$) zur Tyrodelösung der beschriebenen Zusammensetzung.

Nur in einigen Versuchen, bei denen die Hühnerherzen durch Dimethylphenylpiperazinium stimuliert wurden, änderte sich der Zeitabstand zwischen den Reizungen, was an entsprechender Stelle erläutert ist.

Zu jeder Versuchsreihe wurden Kontrollversuche durchgeführt. Um den Einfluß von Atropin oder Oxotremorin auf Acetylcholinfreisetzung und Herzfrequenz zu bestimmen, wurde jeweils die 1. Vagusstimulation als Kontrollreizung durchgeführt und die 2. Vagusstimulation nach 15-minütiger Perfusion mit Atropin- oder Oxotremorin-haltiger Tyrodelösung.

Gemessen wurde in allen Versuchen die Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen, jeweils vor Vagusstimulation (Ruhefreisetzung = R) und während Vagusstimulation (Stimulationsfreisetzung = S). Außerdem wurde die Herzfrequenz unter verschiedenen Bedingungen registriert.

Für jeden Versuch wurde die Acetylcholinfreisetzung während der 2. Vagusstimulation (S_2) in Relation gesetzt zu der Acetylcholinfreisetzung während der 1. Vagusstimulation (S_1). Der Quotient S_2/S_1 gibt an, welcher Bruchteil der Acetylcholinabgabe der 1. Reizung während der 2. Reizung erreicht wurde.

Entsprechend wurde auch für die Ruhefreisetzung der Quotient R_2/R_1 errechnet, um so die Ruhefreisetzung vor der 1. und vor der 2. Reizperiode vergleichen zu können. Die Absolutwerte der Acetylcholinfreisetzung in (pmol/g x min) sind bei den Versuchsreihen mit angegeben, um Vergleiche der verschiedenen Versuchsreihen untereinander und mit Literaturwerten zu erleichtern.

e) Statistische Auswertung

Jedes Experiment wurde an mindestens einem weiteren Versuchspräparat wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Die Anzahl der verwendeten Versuchspräparate ist bei jeder Versuchsreihe mit n angegeben. Für die Ergebnisse jeder Versuchsreihe wurde der Mittelwert $\bar{x}$ und der mittlere Fehler ($\pm S\bar{x}$) errechnet.

Um zu ermitteln, ob 2 Ergebnisse signifikant voneinander verschieden sind, wurde jeweils die Irrtumswahrscheinlichkeit p mit dem t-Test nach STUDENT berechnet. Für die Arbeit wurden verwendet: a) der verbundene t-Test, um zu berechnen, ob die Acetylcholinfreisetzung während der 2. Reizung von der während der 1. Reizung des gleichen Herzens signifikant verschieden ist und b) der unverbundene t-Test zum Vergleich mit den Kontrollversuchen.

III. ERGEBNISSE

A Vagusstimulation mit Stromimpulsen

1. Kontrollversuche

a) ohne Cholinesterasehemmung

In 8 Kontrollversuchen wurden die Herzen von Beginn der Präparation bis zum Ende der Messungen nur mit Tyrodelösung perfundiert.

Die Nerven wurden mit einer Reizfrequenz von 20 Hz ($n = 4$) und 3 Hz ($n = 4$) stimuliert. Die Vagusreizung dauerte jeweils 2 Minuten lang.

In den 20 Hz-Kontrollversuchen wurden während der ersten Vagusreizung 242 ± 34 pmol/g x min (S_1) und während der zweiten Vagusreizung 230 ± 38 pmol/g x min (S_2) aus dem Hühnerherzen abgegeben ($S_2/S_1 = 0,97 \pm 0,16$; $n = 4$).

Die Durchführung der Kontrollversuche bei einer Reizfrequenz von 3 Hz ($n = 4$) erbrachte ähnliche Ergebnisse: $S_2/S_1 = 0,92 \pm 0,24$, $n = 4$. Während der ersten Vagusreizung wurden 111 ± 22 pmol/g x min (S_1) aus den Herzen freigesetzt und während der zweiten Vagusreizung 97 ± 12 pmol/g x min (S_2).

In den bisher erwähnten Kontrollversuchen ($n = 8$) wurde vor jeder Vagusreizung eine Minute lang das vom spontan schlagenden Herzen heruntertropfende Perfusat gesammelt und dessen Acetylcholingehalt bestimmt. In den 20 Hz-Kontrollversuchen betrug die gemessene Acetylcholinfreisetzung vor der 1. Reizung im Mittel $R_1 = 29$ pmol/g x min und vor der 2. Reizung $R_2 = 31$ pmol/g x min und in den 3 Hz-Kontrollversuchen vor der 1. Reizung $R_1 = 23$ pmol/g x min und vor der 2. Reizung $R_2 = 29$ pmol/g x min. In jeder der beiden Versuchsreihen war bei einem Herzen keine Ruhefreisetzung meßbar. Die Ruhewerte in den beiden Versuchsreihen sind nicht signifikant voneinander verschieden (Abb. 1). Es war $R_2/R_1 = 1,06 \pm 0,3$ ($n = 4$) in der Kontrollversuchsreihe mit 20 Hz-Vagusstimulation und $R_2/R_1 = 1,14 \pm 0,4$ ($n = 4$) in der Kontrollversuchsreihe mit 3 Hz-Vagusstimulation.

b) mit Cholinesterasehemmung

Als Cholinesterasehemmstoff wurde Eserin (= Physostigmin) in der Konzentration $10^{-6}M$ verwendet. Durch den Zusatz von Eserin $10^{-6}M$ zur Perfusionslösung werden 95 % der Cholinesteraseaktivität des Hühnerherzens gehemmt (DIETERICH et al., 1976).

Die Kontrollversuche mit Cholinesterasehemmung unterscheiden sich von den bisher beschriebenen Kontrollversuchen dadurch, daß 15 Minuten vor Beginn der ersten Reizperiode auf die Eserin-haltige Tyrodelösung umgeschaltet wurde, mit der die Herzen bis Versuchsende perfundiert wurden.

Alle mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundierten Hühnerherzen zeigten eine meßbare spontane Ruhefreisetzung. Diese betrug in den 4 Kontrollversuchen vor der 1. Reizung $R_1 = 84 \pm 11$ pmol/g x min und vor der 2. Reizung $R_2 = 75 \pm 15$ pmol/g x min ($R_2/R_1 = 0,87 \pm 0,09$).

Zur Vagusstimulation wurde die Reizfrequenz 3 Hz verwendet. Die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung betrug während der 1. Stimulation $S_1 = 219 \pm 14$ pmol/g x min und während der 2. Stimulation $S_2 = 219 \pm 28$ pmol/g x min. ($S_2/S_1 = 0,99 \pm 0,09$, $n = 4$).

In 3 der 4 Eserin-Kontrollversuche wurden die Nervi vagi jeweils 5 Minuten lang mit 3 Hz stimuliert, um weitere Aussagen über den Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung zu gewinnen. Sowohl während der ersten als auch während der zweiten Vagusstimulationsperiode bleibt die Acetylcholinfreisetzung 5 Min. lang gleich hoch (siehe Tab. 3 und Abb. 3).

Verwendet man zur Berechnung des Quotienten S_2/S_1 die jeweiligen 5-Minuten-Werte, ergibt sich $S_2/S_1 = 0,89 \pm 0,11$ ($n = 3$).

In zwei Versuchen wurde nach 20-minütiger Perfusion mit Eserin-haltiger Tyrodelösung noch eine dritte Vagusreizung vorgenommen, ebenfalls 5 Min. lang. S_3/S_1 beträgt $0,93 \pm 0,2$ ($n = 2$). Während der dritten Reizperiode war die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung nicht geringer als während der zweiten Reizperiode. Die Ergebnisse der Acetylcholinbestimmung sind am gleichen mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundierten Herzen also 2mal in 20-minütigen Abständen reproduzierbar.

- c) vergleichende Zusammenfassung der Kontrollversuche
 In keiner der Kontrollversuchsreihen zeigt die Acetylcholinfreisetzung während der zweiten oder dritten Vagusstimulation eine signifikante Abweichung gegenüber der ersten Vagusstimulation.
 Gleiches gilt für die Acetylcholinruhefreisetzung.
 In Tab. 1 und Abb. 1 sind die Ergebnisse der Kontrollversuchsreihen zusammengefaßt.

Tabelle 1: Acetylcholinfreisetzung in den Kontrollversuchen

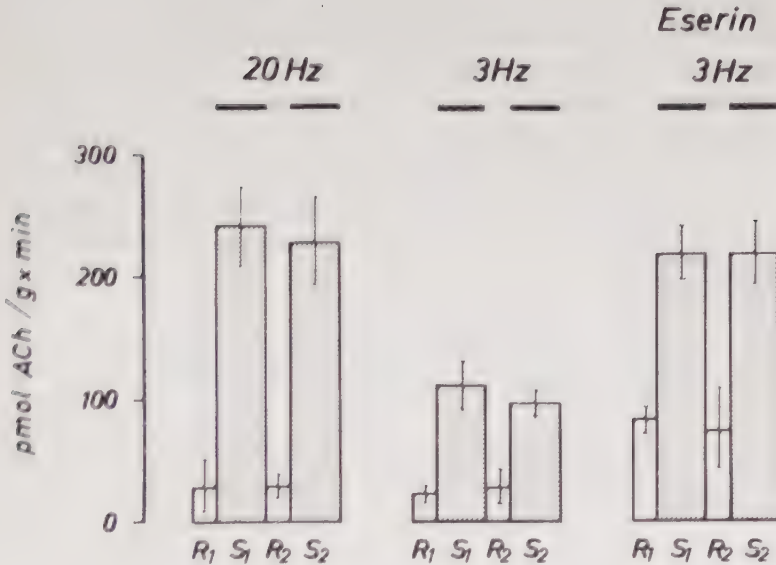
	R_1 (pmol/g x min)	R_2/R_1	S_1 (pmol/g x min)	S_2/S_1	n
20 Hz	29 ± 24	$1,06 \pm 0,30$	242 ± 34	$0,97 \pm 0,16$	4
3 Hz	23 ± 8	$1,14 \pm 0,40$	111 ± 22	$0,92 \pm 0,24$	4
mit Eserin $10^{-6}M$					
3 Hz	84 ± 11	$0,87 \pm 0,09$	219 ± 14	$0,99 \pm 0,09$	4

Die Nervi vagi wurden im Abstand von 20 Minuten elektrisch stimuliert; in den Versuchen ohne Cholinesterasehemmung mit 20 Hz und 3 Hz und in den Versuchen mit Cholinesterasehemmung durch Eserin $10^{-6}M$ mit 3 Hz. Gemessen wurde die Acetylcholinfreisetzung jeweils eine Minute vor (R_1 und R_2) und während der zweiminütigen Vagusstimulation (S_1 und S_2).

Während die Herzen mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundiert werden, ist sowohl die Acetylcholinruhefreisetzung als auch die durch Vagusreizung mit 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung signifikant größer als in den Kontrollversuchen ohne Cholinesterasehemmung.

Werden aber die Nervi vagi ohne Cholinesterasehemmung mit 20 Hz gereizt, setzen die Herzen etwas mehr Acetylcholin frei als wenn die Reizung mit Cholinesterasehemmung mit 3 Hz erfolgt.

Abb. 13: Acetylcholinfreisetzung in den Kontrollversuchen



Die Nervi vagi wurden im Abstand von 20 Minuten je 2 Minuten lang stimuliert, ohne Cholinesterasehemmung (20 Hz, 3 Hz) und mit Cholinesterasehemmung durch Eserin 10^{-6} M (3 Hz).

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Acetylcholinfreisetzungswerte eine Minute vor (R_1 und R_2) und während der zweiminütigen Vagusstimulation (S_1 und S_2) mit dem zugehörigen $\overline{S\bar{X}}$.

$n = 4$ in allen Versuchen.

2. Einfluß von Atropin auf die Acetylcholinfreisetzung

a) ohne Cholinesterasehemmung

Es wurde untersucht, wie sich der Zusatz von Atropin in den Konzentrationen $10^{-8}M$, $10^{-7}M$ und $10^{-6}M$ auf die durch Vagusstimulation mit 20 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung auswirkt. Entsprechend den Kontrollversuchen (Abb. 1) wurden die Nervi vagi 2mal im Abstand von 20 Minuten 2 Minuten lang elektrisch stimuliert. Die erste Nervenstimulation (S_1) erfolgte unter Kontrollbedingungen; 15 Minuten vor und während der zweiten Nervenstimulation (S_2) wurden die Herzen mit Atropin-haltiger Tyrodelösung perfundiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt und in Abb. 2 graphisch dargestellt.

Tabelle 2: Steigerung der Acetylcholinfreisetzung während 20 Hz-Vagusstimulation in Gegenwart von Atropin

	S_1 (pmol/g x min)	S_2/S_1	t-Test verb.	n
Atropin $10^{-8}M$	169 ± 21	$1,36 \pm 0,06$	$p < 0,01$	3
Atropin $10^{-7}M$	178 ± 42	$1,40 \pm 0,10$	$p < 0,01$	3
Atropin $10^{-6}M$	221 ± 19	$1,50 \pm 0,15$	$p < 0,01$	6

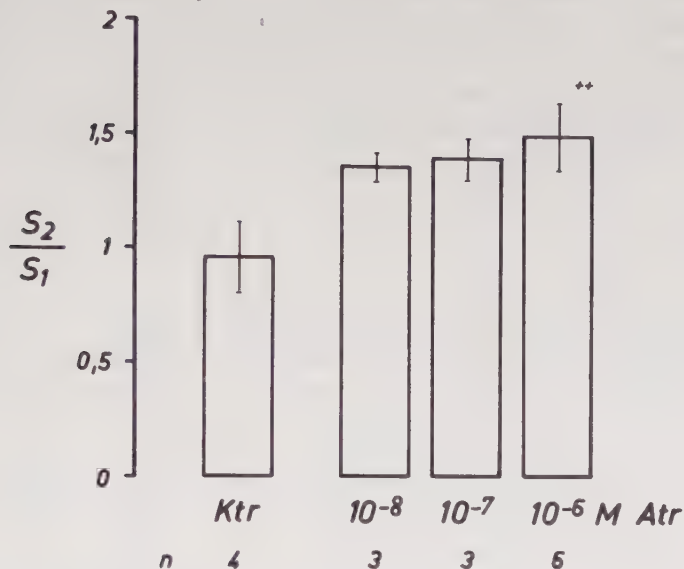
(Erläuterungen im Text und bei Abb. 2)

Für alle getesteten Atropin-Konzentrationen ergibt der verbundene t-Test, daß die Acetylcholinfreisetzung bei Reizung nach Perfusion mit Atropin-haltiger Tyrodelösung signifikant höher ist als während der ersten Vagusreizung ohne Atropin. Im Vergleich mit den Kontrollversuchen (Tab. 1) durch den unverbundenen t-Test erbrachte nur Atropin $10^{-6}M$ eine signifikante ($p < 0,01$) Steigerung.

Auf die Ruhefreisetzung übt Atropin in diesen Konzentrationen keinen signifikanten Effekt aus.

In 7 der Versuche war vor der ersten Vagusstimulation keine Ruhefreisetzung meßbar, ebenso in 6 Versuchen vor der zweiten Vagusreizung, nachdem Atropin 14 Min. lang auf das Herz eingewirkt hatte.

Abb. 2: Steigerung der Acetylcholinfreisetzung während 20 Hz-Vagusstimulation in Gegenwart von Atropin



Die Nervi vagi wurden 2mal mit 20 Hz stimuliert (S_1 , S_2) jeweils 2 Minuten lang. Die erste Stimulation (S_1) erfolgte unter Kontrollbedingungen, die zweite (S_2) nach 15-minütiger Vorperfusion mit Atropin in den angegebenen Konzentrationen.

Dargestellt ist die relative Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin (S_2/S_1) mit dem mittleren statistischen Fehler $\overline{S\overline{X}}$.

$S_1 = 242 \pm 34$ pmol/g x min in den 20 Hz-Kontrollversuchen (Tab. 1)

$S_1 = 221 \pm 19$ pmol/g x min vor Atropin 10^{-6} M

** signifikanter Unterschied zu den Kontrollversuchen $p < 0,01$ im unverbundenen t-Test.

Wurde anstelle von 20 Hz die niedrigere Reizfrequenz 3 Hz zur Vagusstimulation verwendet, so konnte bei sonst identischem Versuchsaufbau keine Steigerung der Acetylcholinausschüttung durch Atropin 10^{-6}M erzielt werden. Die absolute Acetylcholinfreisetzung betrug bei der 3 Hz-Vagusreizung ohne Atropin $S_1 = 128 \pm 28 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ und mit Atropin $S_2 = 129 \pm 20 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ ($S_2/S_1 = 1,04 \pm 0,06$, $n = 4$).

Auch die in 3 der 4 Versuche meßbare Ruhefreisetzung wurde durch die Herzperfusion mit Atropin-haltiger Tyrodelösung nicht wesentlich beeinflusst. Vor der ersten Vagusstimulation wurden $R_1 = 34 \pm 17 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ und nach Perfusion mit Atropin 10^{-6}M $R_2 = 40 \pm 13 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ gemessen ($n = 4$).

b) mit Cholinesterasehemmung

Atropin 10^{-6}M steigerte die durch Vagusreizung mit 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung auf das 4-fache, wenn die Hühnerherzen unter Beibehaltung des Versuchsschemas mit Eserin(10^{-6}M)-haltiger Tyrodelösung perfundiert wurden ($n = 5$) (siehe Abb. 4). Der unverbundene t-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied zu den entsprechenden Kontrollversuchen (Tab. 1) von $p < 0,001$.

Als Absolutwerte der Acetylcholinfreisetzung aus dem Herzen ergaben sich $S_1 = 217 \pm 59 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ während Vagusreizung ohne Atropin und $S_2 = 795 \pm 177 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ mit Atropin 10^{-6}M , wenn man die Freisetzung der ersten und zweiten Reizminute berücksichtigt. ($S_2/S_1 = 3,96 \pm 0,53$, $n = 5$)

Die Acetylcholinruhefreisetzung betrug in dieser Versuchsserie ($n = 5$) vor der ersten Vagusstimulation $R_1 = 90 \pm 12 \text{ pmol/g} \times \text{min}$, was der Ruhefreisetzung in den Kontrollversuchen entspricht (Tab. 1). Nach 14-minütiger Perfusion mit Atropin 10^{-6}M war die Acetylcholinruhefreisetzung auf $R_2 = 41 \pm 11 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ gesenkt ($R_2/R_1 = 0,44 \pm 0,07$, $n = 5$).

Diese Senkung der Ruhefreisetzung durch Atropin erwies sich im unverbundenen t-Test als signifikant ($p < 0,05$).

c) Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während 5 Minuten Vagusstimulation mit 3 Hz

In 4 der 5 Versuche mit Eserin und Atropin dauerten die Vagusstimulationen S_1 und S_2 jeweils 5 Minuten lang ($S_2/S_1 = 3,42 \pm 0,21$, $n = 4$, wenn man die Acetylcholinfreisetzung pro 5 Minuten der Berechnung zugrundelegt). Um zu untersuchen, ob Atropin einen Einfluß auf den Zeitverlauf der durch 3 Hz hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung hat, wurden in einminütigen Abständen Perfusatproben zur Messung des Acetylcholingehaltes gesammelt. Die Ergebnisse sind für die Eserin-Kontrollversuche und für die Eserin-Versuche zur Überprüfung des Atropin-Effektes in der Tabelle 3 und Abb. 3 nebeneinander zusammengestellt.

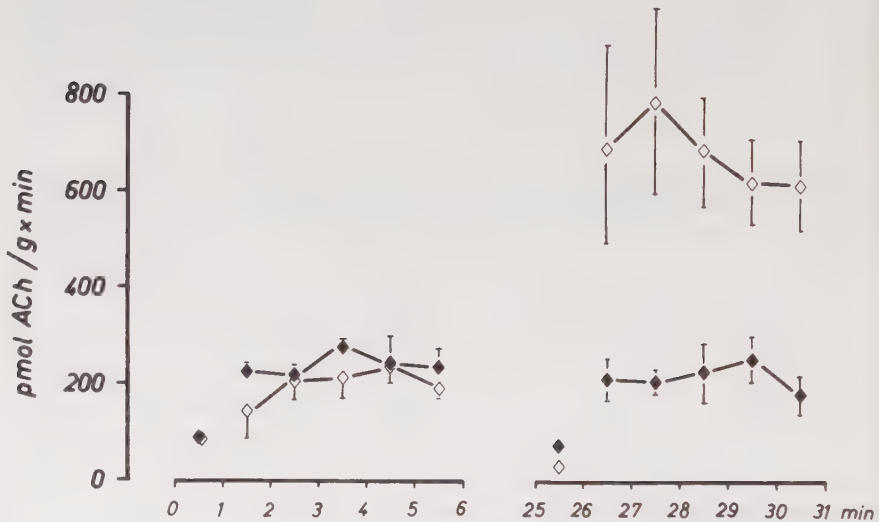
Tabelle 3: Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während Vagusstimulation mit 3 Hz

	S_1	S_2	
	1.min	226 $\pm$ 14	209 $\pm$ 50 pmol/g
	2.min	217 $\pm$ 24	207 $\pm$ 24 pmol/g
Ktr.	3.min	277 $\pm$ 18	226 $\pm$ 68 pmol/g $n = 3$
	4.min	240 $\pm$ 61	257 $\pm$ 49 pmol/g
	5.min	234 $\pm$ 39	177 $\pm$ 41 pmol/g
	S_1	S_2	
	1.min	145 $\pm$ 59	684 $\pm$ 228 pmol/g
	2.min	205 $\pm$ 40	787 $\pm$ 202 pmol/g
Atr.	3.min	213 $\pm$ 49	683 $\pm$ 121 pmol/g $n = 4$
	4.min	237 $\pm$ 45	621 $\pm$ 91 pmol/g
	5.min	190 $\pm$ 20	613 $\pm$ 95 pmol/g

Die beiden Nervi vagi wurden im Abstand von 20 Minuten je 5 Minuten lang mit 3 Hz stimuliert. Die Herzen wurden in den Kontrollversuchen (Ktr.) mit Eserin($10^{-6}M$)-haltiger Tyrodelösung perfundiert, in den Atropin-Versuchen (Atr.) 15 Minuten vor S_2 zusätzlich mit Atropin $10^{-6}M$.

Atropin bewirkt keine signifikante Änderung des Zeitverlaufs. Die beobachtete Steigerung der reizbedingten Acetylcholin-freisetzung auf das 3- bis 4-fache muß demnach auf anderen Mechanismen beruhen.

Abb. 3: Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während 5 Minuten langer Vagusstimulation mit 3 Hz



(Siehe Erläuterungen zu Tabelle 3)

◆ R_1, S_1, R_2, S_2 Eserin $10^{-6}M$ - Kontrollversuche ($n = 3$)

◇ R_1, S_1 Eserin $10^{-6}M$

R_2, S_2 Eserin + Atropin $10^{-6}M$ ($n = 4$)

Abszisse: Minute des Versuchs

Ordinate: Acetylcholinfreisetzung (pmol/g x min)

d) vergleichende Zusammenfassung der Effekte von Atropin $10^{-6}M$ auf die Acetylcholinfreisetzung

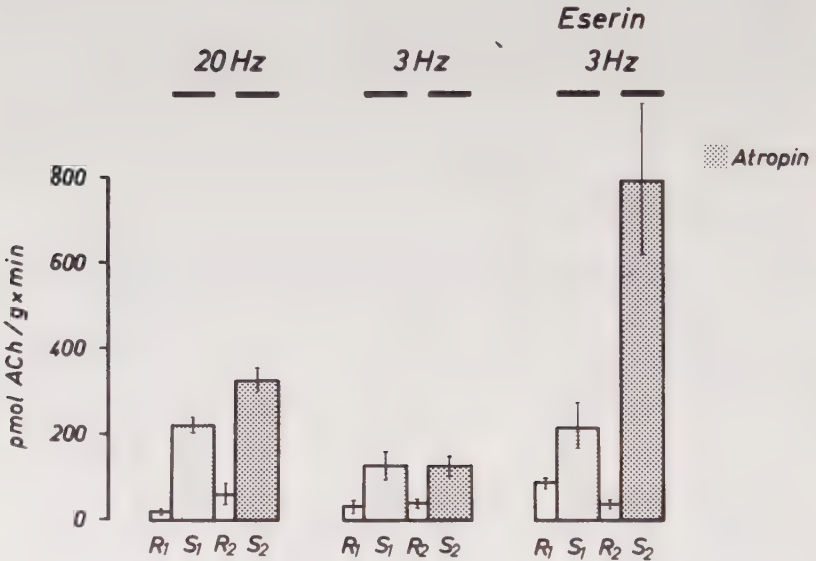
Wurden die Nervi vagi ohne Cholinesterasehemmung mit 20 Hz stimuliert, bewirkte der Zusatz von Atropin $10^{-6}M$ eine Steigerung der Acetylcholinfreisetzung auf fast 1,5-fach höhere Werte. Während bei Vagusstimulation mit 3 Hz durch Zusatz von Atropin kein signifikanter Effekt erzielt wurde, erbrachte die Wiederholung der Versuche unter Verwendung Eserin-haltiger Tyrodelösung eine Erhöhung der gemessenen Acetylcholinwerte auf das 3- bis 4-fache durch Einwirkung von Atropin $10^{-6}M$ (siehe Tab. 4 und Abb. 4).

Tabelle 4: Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin $10^{-6}M$ im Vergleich mit den Kontrollversuchen

	S_1 (pmol)/g x min)	S_2/S_1	n	t-Test unverbunden
ohne Eserin				
Ktr. 20 Hz	242 $\pm$ 34	0,97 $\pm$ 0,16	4	p < 0,01
Atr. 20 Hz	221 $\pm$ 19	1,50 $\pm$ 0,15	6	
Ktr. 3 Hz	111 $\pm$ 22	0,92 $\pm$ 0,24	4	p < 0,25
Atr. 3 Hz	128 $\pm$ 28	1,04 $\pm$ 0,06	4	
mit Eserin $10^{-6}M$				
Ktr. 3 Hz	219 $\pm$ 14	0,99 $\pm$ 0,09	4	p < 0,001
Atr. 3 Hz	217 $\pm$ 59	3,96 $\pm$ 0,53	5	

Die Nervi vagi aller Hühnerherzen wurden zweimal elektrisch stimuliert (S_1 , S_2). Der Zeitabstand zwischen beiden Vagusstimulationen betrug konstant 20 Minuten. Zu den Kontrollversuchen (Ktr.) vergleiche Tabelle 1. Atropin $10^{-6}M$ (Atr.) wirkte 15 Minuten vor und während der zweiten Vagusstimulation (S_2) auf die Herzen ein. Aufgelistet ist die jeweilige Acetylcholinfreisetzung während der ersten Stimulation (S_1), wobei die erste und zweite Stimulationsminute zusammengefaßt sind, sowie S_2/S_1 , die Anzahl der Versuche (n) und die Signifikanz der Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin im Vergleich mit den Kontrollversuchen.

Abb. 4: Wirkungen von Atropin $10^{-6}M$ auf die Acetylcholinfreisetzung (vgl. Abb. 1, Kontrollen)



Die erste Vagusstimulation erfolgte unter Kontrollbedingungen, die zweite nach 15-minütiger Einwirkung von Atropin $10^{-6}M$. Dargestellt sind die Mittelwerte der Acetylcholinfreisetzung jeweils eine Minute vor (R_1 , R_2) und während der 2-minütigen Vagusreizung (S_1 und S_2) mit dem jeweiligen mittleren Fehler $\bar{S}\bar{X}$. Alle Werte wurden im Text erläutert (siehe auch Tab. 4).

Die Anzahl der verwendeten Herzen betrug in den Versuchsreihen ohne Cholinesterasehemmung

mit 20 Hz-Vagusstimulation $n = 6$

mit 3 Hz-Vagusstimulation $n = 4$

mit Cholinesterasehemmung durch Eserin $10^{-6}M$

mit 3 Hz-Vagusstimulation $n = 5$

3. Änderungen der Herzschlagfrequenz durch Acetylcholin, Eserin und Atropin

Bei den meisten der bisher beschriebenen Versuche wurden nicht nur die Mengen des freigesetzten Acetylcholins bestimmt, sondern auch die Änderungen der Herzfrequenz registriert.

Tabelle 5: Änderungen der Herzschlagfrequenz durch Vagusstimulation

	FR ₁	FS ₁	FR ₂	FS ₂	n
	Schläge/min				
ohne Eserin					
Ktr. 20 Hz	146 ± 6	86 ± 18	140 ± 24	66 ± 2	2
Atr. 20 Hz	134 ± 10	78 ± 6	187 ± 5	191 ± 7	4
Ktr. 3 Hz	125 ± 15	72 ± 9	138 ± 10	79 ± 11	4
Atr. 3 Hz	127 ± 14	79 ± 11	148 ± 13	148 ± 3	4
mit Eserin 10 ⁻⁶ M					
Ktr. 3 Hz	95 ± 12	77 ± 4	88 ± 13	69 ± 7	4
Atr. 3 Hz	78 ± 11	70 ± 7	169 ± 15	172 ± 7	5

Jeweils eine Zeile faßt die Frequenzbeobachtungen einer Versuchsreihe zusammen.

Es wurde die Herzfrequenz während der Ruheperfusion eine Minute vor Vagusreizung (Ruhefrequenz = FR) und während der Nervenstimulation (FS) ausgezählt. FR₁ und FS₁ entsprechen der Schlagfrequenz vor bzw. während der ersten Reizperiode und FR₂ und FS₂ analog der Schlagfrequenz zu dem Zeitpunkt, als die Acetylcholinwerte R₂ und S₂ gemessen wurden (vgl. Tab. 4). Alle Werte sind in (Schläge/Minute) ausgedrückt.

Unmittelbar vor dem Umschalten auf Eserin(10⁻⁶M)-haltige Perfusionslösung wurde die Ruhefrequenz dieser Herzen mit FR₀ = 146 ± 8 Schläge/min (n = 9) bestimmt.

Atropin-Konzentration in allen Versuchsreihen 10⁻⁶M.

Wie Tabelle 5 zeigt, übt die Vagusstimulation an den mit Tyrodelösung perfundierten Herzen einen deutlichen negativ chronotropen Effekt aus. Die Herzfrequenz sinkt sofort bei Einschalten des Stromes und bleibt während der zweiminütigen elektrischen Reizung konstant (vgl. Abb. 5).

Durch Vagusreizung mit 3 Hz wurde die Herzfrequenz auf $59 \pm 2 \%$ ($n = 6$) und durch Vagusreizung mit 20 Hz auf $56 \pm 4 \%$ ($n = 8$) der vor Reizung gezählten Ruhefrequenz gesenkt. Vagusreizung mit 20 Hz bewirkt eine mehr als doppelt so hohe Acetylcholinfreisetzung im Vergleich zur Reizung mit 3 Hz. Aber die Herzschlagfrequenz wird dadurch nur unwesentlich stärker negativ chronotrop beeinflusst.

Unmittelbar nach Abschalten des Reizstromes beobachtet man eine Tachykardie, die während der ersten halben Minute nach Vagusreizung maximal ist, um dann wieder auf die ursprüngliche Ruhefrequenz zurückzukehren (Abb. 5).

Nach 20 Hz-Stimulation erreicht die Tachykardie 15 Sekunden nach Abschalten des Reizstromes $144 \pm 10 \%$ ($n = 6$), nach 3 Hz-Stimulation $135 \pm 13 \%$ ($n = 8$) der Herzschlagfrequenz vor Reizung.

In den Kontrollversuchen ohne Cholinesterasehemmung war nach 20-minütiger Perfusion mit Tyrodelösung im Mittel die gleiche Herzfrequenz (FR_2) zu zählen wie vor der ersten Vagusstimulation (FR_1). ($FR_2/FR_1 = 1,07 \pm 0,07$; $n = 6$)

Der Cholinesterasehemmstoff Eserin wirkt negativ chronotrop. Durch Eserin ($10^{-6}M$) wird die Ruheschlagfrequenz der Hühnerherzen auf $61 \pm 6 \%$ der vor Umschalten auf Eserin-haltige Tyrodelösung gemessenen Ruhewerte gesenkt ($n = 9$). Nach etwa 3-minütiger Perfusion mit der Eserin-haltigen Tyrodelösung ist das Frequenz-Minimum erreicht und bleibt konstant, solange keine anderen Reize auf das Herz einwirken (Abb. 5). Die in Tab. 5 aufgelisteten Ruheschlagfrequenzen mit Eserin wurden nach 15-minütiger Vorperfusion mit Eserin-haltiger Tyrodelösung gezählt.

Durch Vagusstimulation mit 3 Hz wurde die Ruheschlagfrequenz der bereits mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundierten Herzen nur unwesentlich weiter gesenkt. ($FS_1/FR_1 = 0,87 \pm 0,05$, $n = 9$). Betrachtet man dagegen die Absolutwerte (Tab. 5), so zeigt sich, daß während Reizung mit 3 Hz bei den Herzen der verschiedenen Versuchsreihen mit und ohne Eserin etwa gleichviele Herzschläge pro Minute gezählt wurden.

Durch den Zusatz von Atropin $10^{-6}M$ zur Perfusionslösung wurde die Ruheschlagfrequenz der Hühnerherzen beschleunigt. Wurden die Herzen mit Eserin $10^{-6}M$ und Atropin $10^{-6}M$ zugleich perfundiert, war ihre Schlagfrequenz mehr als doppelt so hoch als während Perfusion mit Eserin-haltiger Tyrodelösung ohne Atropin (Tab. 6).

Während Atropin auf die Herzen einwirkte, konnte in keiner der beschriebenen Versuchsreihen ein signifikanter chronotroper Effekt durch Vagusstimulation beobachtet werden (Tab. 6, Abb. 5).

Tabelle 6: Atropin $10^{-6}M$ beschleunigt die Ruheschlagfrequenz und verhindert den chronotropen Effekt der Vagusstimulation

	FR_2 (Schläge/min)	FR_2/FR_1	FS_2/FR_2	n
ohne Eserin				
Ktr. 20 Hz	140 ± 24	$0,96 \pm 0,08$	$0,47 \pm 0,09$	2
Atr. 20 Hz	187 ± 5	$1,41 \pm 0,09$	$1,00 \pm 0,19$	4
Ktr. 3 Hz	138 ± 10	$1,10 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,05$	4
Atr. 3 Hz	148 ± 13	$1,28 \pm 0,06$	$1,01 \pm 0,06$	4
mit Eserin				
Ktr. 3 Hz	88 ± 13	$0,92 \pm 0,05$	$0,81 \pm 0,10$	4
Atr. 3 Hz	169 ± 15	$2,22 \pm 0,17$	$1,09 \pm 0,55$	5

Siehe Erläuterungen zu Tab. 5

Ktr.: Kontrollversuche

Atr.: Atropin $10^{-6}M$ wirkte 15 Minuten vor und während der zweiten Vagusstimulation auf die Herzen ein.

Abb. 5:

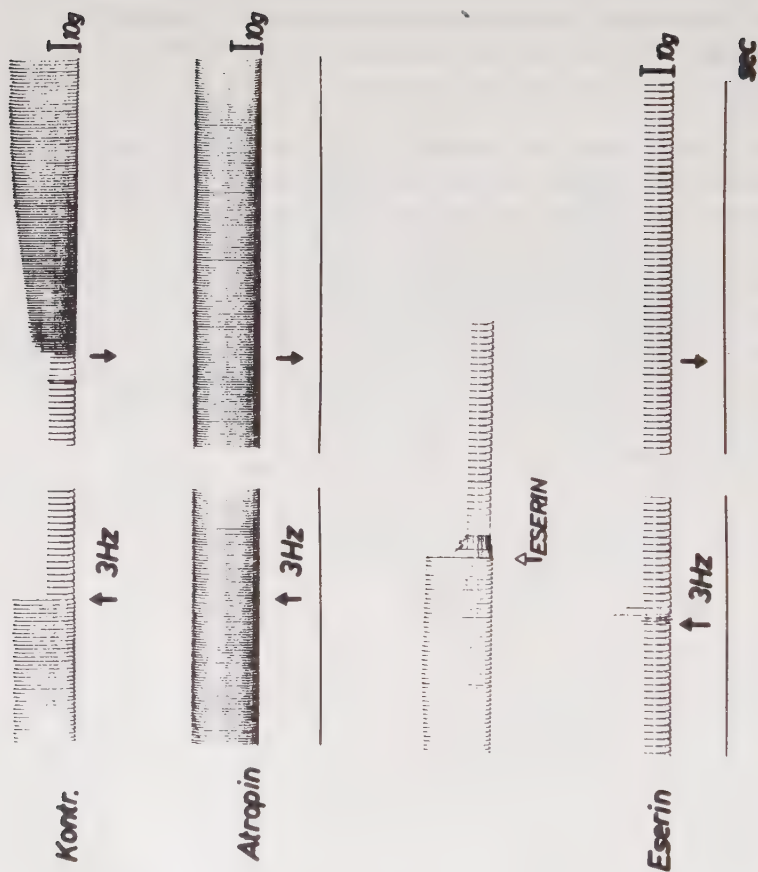


Abb. 5: Herzfrequenzänderungen durch 3 Hz-Vagusstimulation
unter Kontrollbedingungen ohne Eserin (1. Streifen teil)
unter Atropin-Einwirkung (2. Streifen teil)
unter Eserin-Einwirkung (4. Streifen teil)

Die Aktionen des rechten Herzventrikels wurden registriert. Abgebildet sind Ausschnitte aus den Registrierstreifen zweier Herzen. Die beiden oberen Abbildungen sind einem Versuch ohne Cholinesterasehemmung entnommen. Vom Beginn des oberen Registrierstreifen teiles bis zum Beginn des darunter abgebildeten sind 20 Minuten vergangen und Atropin $10^{-6}M$ hat 15 Minuten auf das Herz eingewirkt.

Die beiden unteren Streifen teile sind einem Kontrollversuch mit Eserin $10^{-6}M$ entnommen. Vom Beginn der Eserin-Wirkung ($\uparrow$) bis zur ersten Vagusstimulation sind 15 Minuten vergangen.

Der 1., 2. und 4. Streifen teil zeigen die Herzaktionen vor, während und nach 3 Hz-Vagusstimulation. Anfang und Ende der 2-minütigen Reizung sind durch Pfeile markiert ($\uparrow, \downarrow$).

Die Zeitachse zeigt einen Ausschlag pro Sekunde. Sie ist während der 2-minütigen Reizung konstant unterbrochen dargestellt.

Die Papiergeschwindigkeit betrug 2,5 mm/sec. Zu Beginn der Eserin-Einwirkung wurde die Papiergeschwindigkeit 0,1 mm/sec. gewählt.

4. Oxotremorin-Atropin-Antagonismus

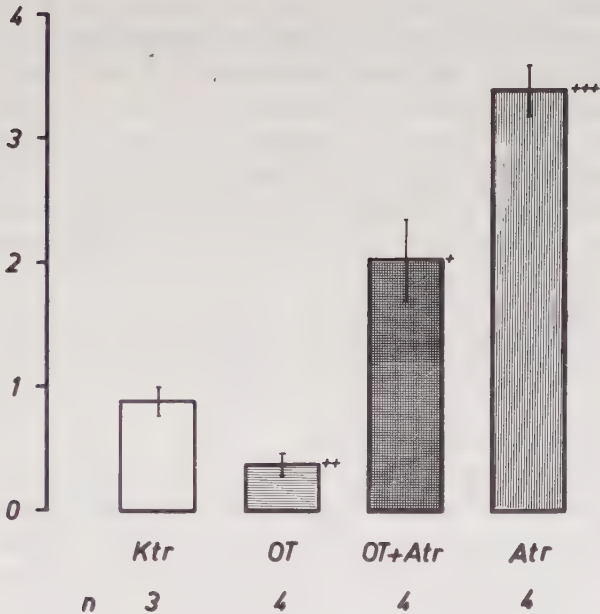
Atropin $10^{-6}M$ steigerte die durch Vagusstimulation mit 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung aus Herzen, welche mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundiert wurden, auf 3- bis 4-fach höhere Werte (Abb. 4, Tab. 4).

Es sollte untersucht werden, ob diese Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin auch am Hühnerherzen, ähnlich wie am Meerschweinchenileum (KILBINGER, 1977), durch den Muskarinagonisten Oxotremorin antagonisierbar ist. Dazu wurden Hühnerherzen vor Atropin-Zusatz mit Oxotremorin($10^{-4}M$)-haltiger Tyrodelösung perfundiert, so daß S_1 unter Kontrollbedingungen, S_2 unter Oxotremorin-Einfluß und S_3 nach weiteren 20 Minuten unter Einfluß von Oxotremorin ($10^{-4}M$) und Atropin ($10^{-6}M$) gemessen wurde. Die Vagusstimulationen erfolgten jeweils 5 Minuten lang mit 3 Hz (S_1 , S_2 , S_3). Während der gesamten Versuchszeit wirkte Eserin ($10^{-6}M$) auf die Herzen ein. Oxotremorin wurde 15 Minuten vor der zweiten und Atropin 15 Minuten vor der dritten Vagusstimulation der Perfusionslösung zugesetzt. Die Eserin-Kontrollversuche mit 5-minütiger Vagusreizung (siehe Seite 13) ergaben, daß sich die Acetylcholinfreisetzung während der dritten Vagusstimulation (S_3) nicht mehr von S_1 unterscheidet als S_2 . Daher ist es gerechtfertigt, den Oxotremorin-Atropin-Antagonismus während der dritten Vagusstimulation (S_3) zu untersuchen.

Wirkten Oxotremorin $10^{-4}M$ und Atropin $10^{-6}M$ gleichzeitig auf die Herzen ein, war zwar die durch 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung noch doppelt so hoch wie in den Eserin-Kontrollen, doch wurde der Atropin-Effekt durch Oxotremorin signifikant ($p < 0,02$ im unverbundenen t-Test) vermindert. Oxotremorin plus Atropin: $S_3/S_1 = 2,04 \pm 0,34$, $n = 4$, Abb. 6
Atropin ohne Oxotremorin: $S_2/S_1 = 3,42 \pm 0,21$, $n = 4$, Abb. 6

Die Ruhefreisetzung wurde durch Einwirken von Oxotremorin und Atropin nicht signifikant verändert. ($R_1 = 78 \pm 9$,
 $R_2 = 65 \pm 34$, $R_3 = 62 \pm 45$)

Abb. 6: Oxotremorin-Atropin-Antagonismus



Alle Herzen wurden mit Eserin(10^{-6} M)-haltiger Tyrodelösung perfundiert.

Die Nervi vagi wurden im Abstand von 20 Minuten je 5 Minuten lang mit 3 Hz stimuliert. Die erste Vagusstimulation erfolgte unter Kontrollbedingungen, die zweite (Ktr., OT, Atr.) bzw. dritte (OT + Atr.) Vagusstimulation unter Einfluß der angegebenen Substanzen.

Ordinate: Verhältnis der Acetylcholinfreisetzung während Vagusreizung in Anwesenheit zur Acetylcholinfreisetzung in Abwesenheit der angegebenen Substanzen

Ktr. : Kontrollversuche, Seite 13

OT : Oxotremorin 10^{-4} M

Atr. : Atropin 10^{-6} M

Signifikante Unterschiede zu den Kontrollversuchen im unverbundenen t-Test: + $p < 0,05$, ++ $p < 0,02$, +++ $p < 0,001$

5. Einfluß von Oxotremorin auf die Acetylcholinfreisetzung

a) mit Cholinesterasehemmung

Oxotremorin $10^{-4}M$ senkt die durch Vagusreizung mit 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung signifikant ($p < 0,02$) im Vergleich mit den Eserin-Kontrollversuchen (Abb. 6).

Die Nervi vagi wurden im Abstand von 20 Minuten je 5 Minuten lang mit 3 Hz stimuliert. Oxotremorin wirkte 15 Minuten vor S_2 auf die Herzen ein (entspricht dem ersten Teil der Versuche zur Untersuchung des Oxotremorin-Atropin-Antagonismus)

$S_1 = 363 \pm 38 \text{ pmol/g} \times \text{min}$, $S_2 = 128 \pm 25 \text{ pmol/g} \times \text{min}$,
 $S_2/S_1 = 0,38 \pm 0,09$, $n = 4$.

Diese signifikante Senkung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung durch Oxotremorin beruht nicht auf einer Änderung des Zeitverlaufs der Acetylcholinfreisetzung (Abb. 7).

b) ohne Cholinesterasehemmung

In 2 Versuchen wurde der Einfluß von Oxotremorin $10^{-5}M$ auf die Acetylcholinfreisetzung ohne Einfluß von Eserin geprüft unter Beibehaltung des beschriebenen Versuchsschemas. Die Vagusstimulation erfolgte jeweils 5 Minuten lang mit 3 Hz. Während Perfusion mit Tyrodelösung wurden bei Vagusstimulation $S_1 = 123$ und $110 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ und nach 15-minütigem Einwirken von Oxotremorin $10^{-5}M$ $S_2 = 66$ und $70 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ aus den Herzen freigesetzt ($S_2/S_1 = 0,59 \pm 0,05$, $n = 2$).

Diese Senkung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung ist im unverbundenen t-Test signifikant ($p < 0,05$) gegenüber den Kontrollversuchen in Abb. 1.

Die Acetylcholinruhefreisetzung aus dem Hühnerherzen blieb von Oxotremorin auch in dieser Versuchsreihe unbeeinflusst ($R_1 = 55$ und $46 \text{ pmol/g} \times \text{min}$, $R_2 = 78$ und $49 \text{ pmol/g} \times \text{min}$).

c) Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während 5 Minuten Vagusstimulation mit 3 Hz

Die Absolutwerte der Acetylcholinfreisetzung während 5-minütiger Vagusstimulation mit 3 Hz vor und nach Perfusion mit Oxotremorin-haltiger Tyrodelösung sind in Tabelle 7 aufge-

listet. In Abb. 7 ist dieser Zeitverlauf der Acetylcholin-freisetzung graphisch dargestellt.

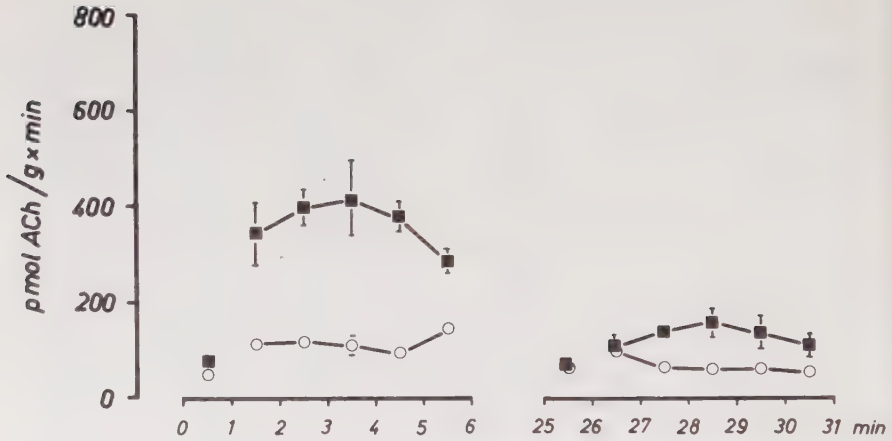
Tabelle 7: Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während 5 Minuten Vagusstimulation mit 3 Hz

		S ₁		S ₂	
	Ruhe	51 ± 5		64 ± 15	pmol/g
ohne Eserin	1.Min	114 ± 3		101 ± 1	pmol/g
Oxotremorin 10 ⁻⁵ M	2.Min	118 ± 26		67 ± 13	pmol/g
(n = 2)	3.Min	112 ± 22		59 ± 2	pmol/g
	4.Min	95 ± 7		61 ± 2	pmol/g
	5.Min	145 ± 26		53 ± 2	pmol/g
	Ruhe	78 ± 9		65 ± 34	pmol/g
mit Eserin 10 ⁻⁶ M	1.Min	344 ± 71		107 ± 24	pmol/g
Oxotremorin 10 ⁻⁴ M	2.Min	398 ± 38		137 ± 30	pmol/g
(n = 4)	3.Min	413 ± 86		157 ± 33	pmol/g
	4.Min	377 ± 40		133 ± 35	pmol/g
	5.Min	284 ± 25		108 ± 24	pmol/g

Die beiden Nervi vagi wurden 2mal im Abstand von 20 Minuten mit einer Frequenz von 3 Hz 5 Minuten lang stimuliert (S₁; S₂). 15 Minuten vor S₂ wurden die Herzen mit Oxotremorin-haltiger Tyrodelösung perfundiert.

Der lineare Zeitverlauf, den die Acetylcholinfreisetzung in den Kontrollreizungen sowohl mit als auch ohne Eserin beschreibt, wird durch Zusatz von Oxotremorin nicht signifikant verändert.

Abb. 7: Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während 5 Minuten langer Vagusstimulation mit 3 Hz



siehe Erläuterungen zu Tabelle 7

R_1, S_1 ohne Oxotremorin

R_2, S_2 nach 15-minütiger Oxotremorin-Perfusion

■ mit Eserin, Oxotremorin 10^{-4} M

○ ohne Eserin, Oxotremorin 10^{-5} M

Abszisse: Minute des Versuchs

Ordinate: Acetylcholinfreisetzung (pmol/g x min)

6. Senkung der Herzfrequenz durch Oxotremorin

An den beiden Herzen, die mit Tyrodelösung ohne Cholinesterasehemmstoff perfundiert wurden, zeigte Oxotremorin $10^{-5}M$ einen negativ chronotropen Effekt. Vor Umschalten auf Oxotremorin-haltige Tyrodelösung wurden als Ruhefrequenz 96/min und 116/min gezählt und nach 15-minütiger Oxotremorin-Einwirkung 64/min bei beiden Herzen. ($FR_2/FR_1 = 0,61 \pm 0,06$, $n = 2$)

Werden Herzen mit Eserin($10^{-6}M$)-haltiger Tyrodelösung perfundiert, so ist bereits durch die Eserin-Wirkung die Herzfrequenz verlangsamt (Abb. 5).

Nach Zusatz von Oxotremorin $10^{-4}M$ schlugen die Herzen ($n = 4$) nicht signifikant langsamer als in den Eserin-Kontrollversuchen. Wenn der negativ chronotrope Effekt durch Eserin erzielt ist, führt Oxotremorin $10^{-4}M$ zu keiner weiteren Frequenzabnahme.

An keinem der mit Oxotremorin-haltiger Tyrodelösung perfundierten Herzen war durch Vagusreizung mit 3 Hz eine Frequenzänderung zu erzielen.

Atropin und Oxotremorin zeigen am Hühnerherzen antagonistische Wirkungen. Atropin steigert und Oxotremorin senkt die durch Vagusstimulation hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung (Abb.6). Damit kann der in bezug auf die Acetylcholinfreisetzung aus dem Meerschweinchenileum beobachtete Oxotremorin-Atropin-Antagonismus (KILBINGER, 1977) auch an einem anderen parasympathisch innervierten Organ einer anderen Tierspezies bestätigt werden.

Da aufgrund der Versuchsergebnisse anzunehmen ist, daß auch die parasympathischen Nerven des Hühnerherzens mit inhibitorischen Muskarinrezeptoren ausgestattet sind, stellt sich die Frage, wo diese inhibitorischen Muskarinrezeptoren lokalisiert sind. Diese Fragestellung nur mit Hilfe von Experimenten mit elektrischer Vagusstimulation zu klären, bereitet Schwierigkeiten. Denn die Vagusstimulation erfolgt präganglionär, so daß die Acetylcholinfreisetzung sowohl durch ganglionäre Rezep-

toren als auch durch am Axon oder am Faserende des postganglionären Neurons lokalisierte Rezeptoren beeinflusst werden kann. Es ist noch nicht bekannt, welche Rezeptoren an der Impulsübertragung im parasympathischen Ganglion beteiligt sind. Die Nikotinrezeptoren des Hühnerherzens sollten unter verschiedenen Versuchsbedingungen selektiv stimuliert werden und die Ergebnisse mit denen, die bei elektrischer Vagusreizung ermittelt wurden, verglichen werden, um so weitere Information über Art und Lokalisation der verschiedenen Acetylcholinrezeptoren im Parasympathikus zu erhalten.

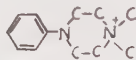
B Vagusstimulation mit DMPP

Dimethylphenylpiperazinium (DMPP) ist eine Substanz mit nikotinartiger Wirkung. Bereits 1951 wurde beschrieben, daß DMPP auf verschiedene Versuchsorgane, die Nickhaut der Katze, die Blase des Hundes, das nach Längendorff perfundierte Kaninchenherz und den Meerschweinchendarm die gleichen Wirkungen ausübt wie Nikotin (CHEN et al., 1951).

Seit dieser Zeit wurde DMPP weit verbreitet als nikotinartige Substanz benutzt. DMPP erregt wie Nikotin nur Nikotinrezeptoren.



Nikotin



DMPP

Diese Eigenschaft des DMPP ist für die Untersuchungen am Hühnerherzen von großem Vorteil. Da DMPP an Muskarinrezeptoren keine intrinsische Aktivität zeigt, bietet sich die Möglichkeit, mit dieser Substanz - im Gegensatz zur elektrischen Vagusstimulation - gezielt nur an den Nikotinrezeptoren die Acetylcholineinwirkung nachzuahmen.

In den verwendeten Konzentrationen interferiert DMPP nicht mit der Gaschromatographie.

7. DMPP-Dosis-Effekt-Beziehung

Es wurden 4 verschiedene DMPP-Konzentrationen getestet, $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ($n = 4$), $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ($n = 3$), $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ($n = 3$) und $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ($n = 4$). Dabei wirkte kein Cholinesterasehemmstoff auf das Versuchspräparat ein.

Entsprechend den Versuchen mit elektrischer Vagusreizung wurde jeweils vor einer Stimulation mit DMPP-haltiger Tyrodelösung eine Minute lang das Ruheperfusat gesammelt und dessen Acetylcholingehalt (R) bestimmt.

Als Beginn der Nervenreizung durch DMPP wird der Moment angesehen, wenn die DMPP-haltige Tyrodelösung in die Koronarien des Herzens eintritt. Das war bei der beschriebenen Apparatur 12 Sekunden nach dem Umschalten auf DMPP-haltige Tyrodelösung.

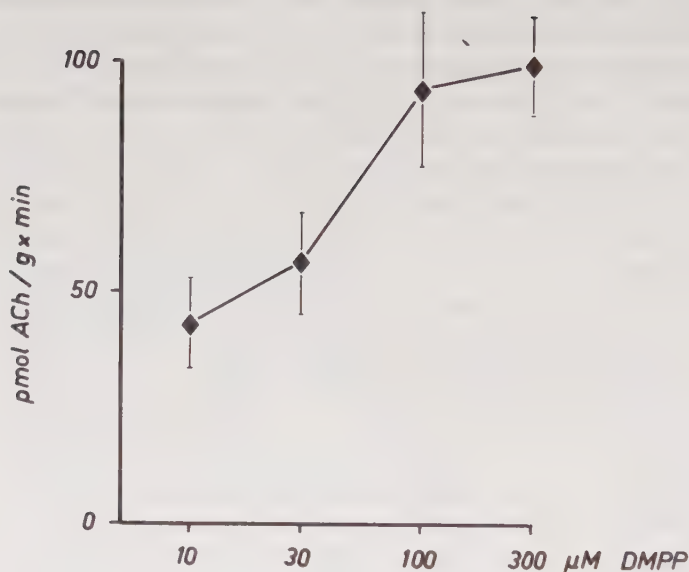
Tabelle 8: Acetylcholinfreisetzung durch DMPP

DMPP-Konz.	D - R	n
$1 \times 10^{-5} \text{M}$	$43 \pm 10 \text{ pmol/g x min}$	4
$3 \times 10^{-5} \text{M}$	$52 \pm 12 \text{ pmol/g x min}$	3
$1 \times 10^{-4} \text{M}$	$94 \pm 16 \text{ pmol/g x min}$	3
$3 \times 10^{-4} \text{M}$	$99 \pm 11 \text{ pmol/g x min}$	4

Die Herzen wurden jeweils eine Minute lang mit DMPP-haltiger Tyrodelösung perfundiert.

Die Ruhefreisetzung (R) des jeweiligen Hühnerherzens wurde von der während DMPP-Perfusion gemessenen Acetylcholinfreisetzung (D) subtrahiert.

Abb. 8: DMPP-Dosis-Effekt-Kurve



Ordinate: Acetylcholinfreisetzung (pmol/g x min)

Abszisse im logarithmischen Maßstab: DMPP-Konzentration

Die Herzen wurden eine Minute lang mit DMPP perfundiert. Die jeweils vor DMPP-Perfusion gemessene Acetylcholinruhefreisetzung (R) wurde von der DMPP-bedingten Freisetzung (D) subtrahiert.

Eingezeichnet sind die für die verschiedenen DMPP-Konzentrationen errechneten Mittelwerte der Acetylcholinfreisetzung $(D - R) \pm S \bar{x}$ (siehe Tab. 8).

8. Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während Perfusion mit DMPP

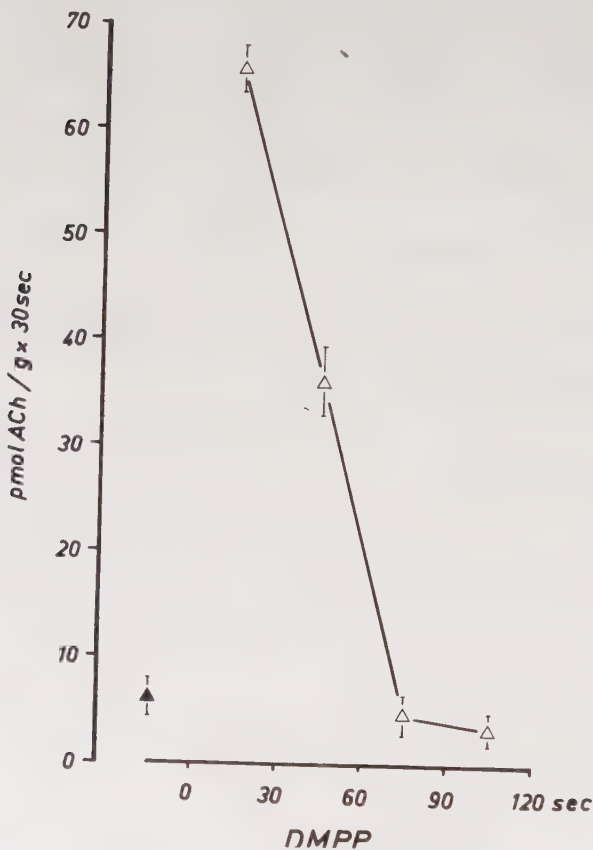
Die gemessene Acetylcholinfreisetzung ist zu Beginn der Perfusion mit DMPP am höchsten (etwa so hoch wie die Acetylcholinfreisetzung während Vagusstimulation mit 3 Hz) und nimmt dann rapide ab, obgleich das Herz unvermindert weiterstimuliert wird. Bereits während der zweiten Minute der DMPP-Perfusion ist die Acetylcholinfreisetzung nicht größer als während Perfusion mit Tyrodelösung (Tab. 9, Abb. 9).

Tabelle 9: Acetylcholinfreisetzung aus den Hühnerherzen durch $3 \times 10^{-4} \text{M}$ DMPP

Ruhefreisetzung	$6 \pm 2 \text{ pmol/g} \times 30 \text{ sec.}$	
Freisetzung durch DMPP		
1. - 30. sec.	$66 \pm 2 \text{ pmol/g} \times 30 \text{ sec.}$	n = 11
31. - 60. sec.	$36 \pm 3 \text{ pmol/g} \times 30 \text{ sec.}$	
61. - 90. sec.	$5 \pm 2 \text{ pmol/g} \times 30 \text{ sec.}$	
91. - 120. sec.	$4 \pm 1 \text{ pmol/g} \times 30 \text{ sec.}$	

An 11 verschiedenen Herzen wurde während zweiminütiger Perfusion mit $3 \times 10^{-4} \text{M}$ DMPP-haltiger Tyrodelösung das Herzperfusat in 30 Sekunden-Abständen gesammelt und der Acetylcholingehalt dieser jeweils 4 Proben bestimmt. Entsprechend wurde vor der DMPP-Perfusion die Ruhefreisetzung aus einer 30-Sekunden-Probe bestimmt.

Abb. 9: Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während DMPP-Perfusion



Hühnerherzen, auf die noch kein anderer Reiz eingewirkt hatte, wurden 2 Minuten lang mit DMPP $3 \times 10^{-4}M$ perfundiert.

Ordinate: Acetylcholinfreisetzung pro 30 sec.,

▲ in Ruhe

△ während DMPP-Perfusion

Abszisse: Perfusionszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm S\bar{X}$ (siehe Tab. 9)

9. Hemmung der durch Stimulation mit 3 Hz hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung nach Perfusion mit DMPP

Die Hemmung der Acetylcholinfreisetzung durch DMPP hält auch noch an, nachdem die DMPP-Perfusion beendet ist. Vagusreizung mit 3 Hz führt noch 5 Minuten nach Beendigung der Perfusion mit DMPP zu keiner Acetylcholinfreisetzung, die signifikant größer als die Ruhefreisetzung ist (Tab. 10, Abb. 10).

Die Nervi vagi werden aber durch DMPP-Einwirkung nicht irreversibel geschädigt (Tab. 10, Abb. 10).

Tabelle 10: Hemmung der Acetylcholinfreisetzung nach DMPP

	S_1	S_2 (nach DMPP)	S_3	
		pmol/g x min		
1. Minute	108 ± 28	16 ± 16	91 ± 27	
2. Minute	132 ± 14	24 ± 8	81 ± 8	$n = 4$
3. Minute		20 ± 3		
4. Minute		24 ± 3		
5. Minute		24 ± 5		

Die Nervi vagi von Hühnerherzen, welche ohne Cholinesterasehemmung mit Tyrodelösung perfundiert wurden, wurden mit 3 Hz stimuliert.

S_1 : unter Kontrollbedingungen (vgl. Tab. 1)

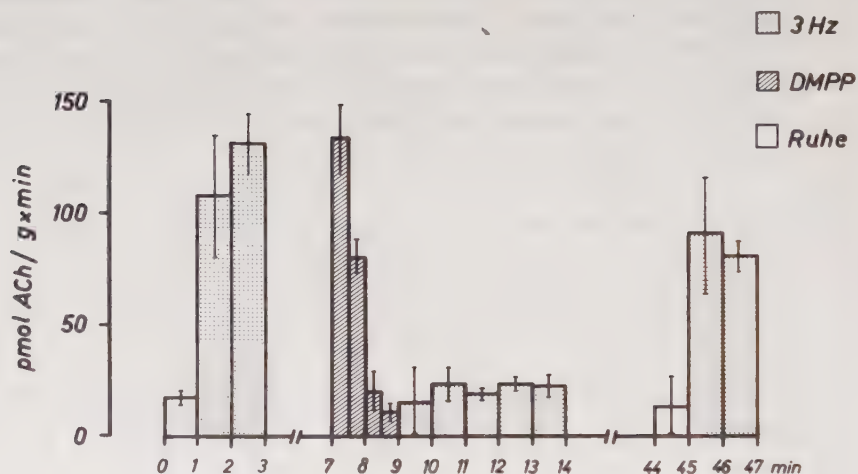
S_2 : unmittelbar nach Beendigung einer 2-minütigen Perfusion mit DMPP $3 \times 10^{-4}M$, aus welcher eine Acetylcholinfreisetzung mit dem charakteristischen Zeitverlauf resultierte

1. - 30. sec.	67 ± 9 pmol/g x min	
31. - 60. sec.	40 ± 4 pmol/g x min	
61. - 90. sec.	10 ± 5 pmol/g x min	$(n = 4)$
91. - 120. sec.	5 ± 2 pmol/g x min	

S_3 : nach 30-minütiger Perfusion mit Tyrodelösung ($S_3/S_1 = 0,71 \pm 0,05$)

Bei all den verwendeten Herzen war zu Versuchsbeginn eine spontane Ruhefrequenz meßbar. Sie betrug eine Minute vor der ersten Stimulation $R_1 = 18 \pm 3$ pmol/g x min, und eine Minute vor der dritten Stimulation $R_3 = 14 \pm 14$ pmol/g x min (siehe Abb. 10).

Abb. 10: Die durch Vagusstimulation bewirkte Acetylcholinfreisetzung ist nach Perfusion mit DMPP gehemmt



n = 4

Ordinate: Acetylcholinfreisetzung (pmol/g x min)

Abszisse: Minute des Versuchs

Versuchsbeschreibung und gemessene Acetylcholinwerte siehe Tabelle 10.

10. a) Hemmung der durch DMPP hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung durch TTX

In der folgenden Versuchsreihe ($n = 4$) wurden die Hühnerherzen dreimal im Abstand von 30 Minuten durch Perfusion mit DMPP $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ stimuliert. (Kontrollversuche siehe Abb. 12).

Die Stimulationsdauer betrug je eine Minute. Die erste Stimulation durch DMPP erfolgte unter Kontrollbedingungen. Die zweite Stimulation erfolgte in Anwesenheit von Tetrodotoxin (TTX). Bereits 5 Minuten vor der zweiten Perfusion mit DMPP wurde TTX (10^{-6} M)-haltige Tyrodelösung durch die Koronarien gepumpt, so daß eine Äquilibration erreicht war.

TTX, das Gift des asiatischen Pufferfisches, hemmt die Fortleitung des Aktionspotentials im Axon, indem es den Na^+ -Einstrom in den Nerv verhindert. Daher kann eine durch Depolarisation im Ganglion entstandene Erregung nicht in physiologischer Weise zum Erfolgsorgan geleitet werden, wenn TTX blockierend auf das Axon einwirkt. Eine direkte Depolarisation des Nervenendes dagegen wird durch TTX nicht verhindert, so daß eine Substanz, die durch Angriff am Nervenende eine Acetylcholinfreisetzung bewirkt, ihren Effekt auch in Anwesenheit von TTX ausübt. Aufgrund dieser Unterscheidungsmöglichkeit kann der Angriffspunkt des DMPP und somit die Lokalisation der Nikotinrezeptoren näher untersucht werden.

Während der ersten Perfusion mit DMPP wurden in dieser Versuchsreihe $D_1 = 85 \pm 9 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ ($n = 4$) aus den Herzen freigesetzt (Abb. 11). Die Acetylcholinruhefreisetzung während Perfusion mit Tyrodelösung betrug eine Minute vor D_1 $R_1 = 19 \pm 8 \text{ pmol/g} \times \text{min}$.

Unter dem Einfluß von TTX war in 3 der 4 Versuche keine Ruhefreisetzung mehr meßbar. In einem Versuch wurde $R_2 = 19 \text{ pmol/g} \times \text{min}$ bestimmt.

Die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung wurde während TTX-Einwirkung auf 10 % des Ausgangswertes gesenkt und lag mit $D_2 = 8,5 \pm 7$ pmol/g x min sogar unter dem ursprünglichen Ruhewert.

Nach 20 Minuten Perfusion mit Tyrodelösung ohne TTX wurden die Messungen an den gleichen Herzen wiederholt. Die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung betrug während dieser dritten Reizperiode $D_3 = 42 \pm 5$ pmol/g x min und lag damit wieder deutlich höher als unter der vorangegangenen TTX-Einwirkung (Abb. 11).

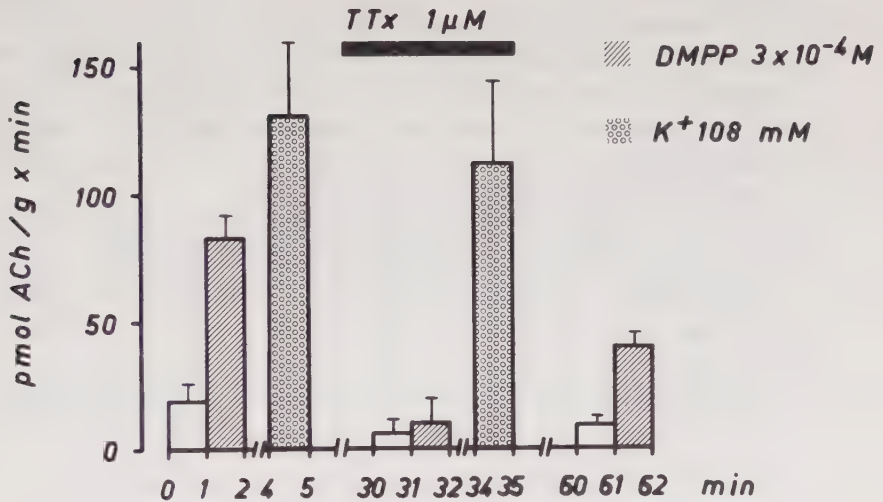
Allerdings wurden, auch wenn man die Tachyphylaxie (Abb. 12) in die Berechnung mit einbezieht, die Kontrollwerte nicht mehr erreicht, was eventuell durch eine TTX-Restwirkung bedingt ist.

b) TTX-Wirkungen auf die durch $K^+ 108$ mM hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung

Jeweils 2 Minuten nach D_1 und nach D_2 wurden die Herzen eine Minute lang mit kaliumreicher Tyrodelösung perfundiert ($K^+ 108$ mM). Diese Erhöhung der Kaliumkonzentration auf das 40-fache führt ebenso wie elektrische Vagusstimulation und Perfusion mit DMPP zu einer erhöhten Acetylcholinfreisetzung aus dem Herzen. Diese durch Erhöhung der Kaliumkonzentration bewirkte Acetylcholinfreisetzung ist unter dem Einfluß von TTX nicht signifikant verändert (Abb. 11).

Während der Kontrollperfusion setzten die Herzen als Antwort auf den Kaliumreiz 132 ± 22 pmol/g x min und unter TTX-Einwirkung 112 ± 35 pmol/g x min Acetylcholin frei.

Abb. 11: TTX hemmt die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung und läßt die durch K^+108mM hervorgerufene unbeeinflusst



n = 4

Ordinate: Acetylcholinfreisetzung (pmol/g x min)

Abszisse: Minute des Versuchs

Hühnerherzen wurden dreimal im Abstand von 30 Minuten je 1 Min. lang durch Perfusion mit Dimethylphenylpiperazinium ($3 \times 10^{-4} M$) - haltiger Tyrodelösung stimuliert. Vor jeder Stimulation wurde 1 Minute lang die Acetylcholinruhefreisetzung bestimmt. Jeweils 2 Minuten nach der Perfusion mit DMPP-haltiger Tyrodelösung wurden die Herzen mit kaliumreicher Tyrodelösung perfundiert.

Von der 25. bis zur 35. Versuchsminute wirkte Tetrodotoxin (1 mM) auf die Herzen ein.

Alle Versuche wurden ohne Cholinesterasehemmung durchgeführt.

11. Hemmung der Acetylcholinfreisetzung durch (+)-Tubocurarin

(+)-Tubocurarin blockiert Nikotinrezeptoren an autonomen Ganglien und am quergestreiften Muskel. Auf die cholinergen Synapsen zwischen den postganglionären Neuronen des Parasympathikus und dem Erfolgsorgan hat (+)-Tubocurarin keinen Einfluß.

(+)-Tubocurarin wurde in den folgenden Versuchen in der Konzentration $10^{-4}M$ verwendet. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Blockade der ganglionären Nikotinrezeptoren sich auf die Acetylcholinfreisetzung auswirkt, wenn die Herzen durch elektrischen Vagusreiz stimuliert werden und wenn sie durch Perfusion mit DMPP stimuliert werden.

Bei den Herzen dieser Versuchsreihe ($n = 3$) war während der anfänglichen Ruheperfusion keine spontane Acetylcholinfreisetzung meßbar. Die Herzen wurden zwei Minuten lang mit 3 Hz stimuliert (S_1) und nach 5-minütiger Perfusion mit Tyrodelösung eine Minute lang mit DMPP $3 \times 10^{-4}M$ stimuliert (D_1). Die Acetylcholinfreisetzung aus dem Herzen entsprach während S_1 und während D_1 der Freisetzung in den entsprechenden Kontrollversuchen (Tab. 11).

Nach 15-minütiger Perfusion mit Tyrodelösung und weiteren 15 Minuten Vorperfusion mit (+)-Tubocurarin $10^{-4}M$ wurden die gleichen Messungen in Anwesenheit von (+)-Tubocurarin wiederholt. Es war keine Ruhefreisetzung bestimmbar.

Vagusreizung mit 3 Hz führte zu keiner meßbaren Acetylcholinausschüttung. Die Nachweisgrenze für die Acetylcholinbestimmung liegt bei etwa 5 bis 10 pmol.

Auch während Perfusion mit DMPP konnte unter (+)-Tubocurarin-Einwirkung in 2 der 3 Versuche gar keine Acetylcholinausschüttung festgestellt werden. Nur bei einem Herzen wurde für die ersten 30 sec. der Perfusion mit DMPP ein Acetylcholinwert ermittelt, der etwas über der unteren Nachweisgrenze lag und 10 pmol/g betrug. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit (+)-Tubocurarin sind in Tab. 11 den entsprechenden Kontrollversuchen gegenübergestellt.

Tabelle 11: Hemmung der Acetylcholinfreisetzung durch (+)-Tubocurarin

	S_1 (3 Hz)	S_2 (3 Hz)	n
	pmol/g x min		
Ktr.	111 ± 22	97 ± 12	4
(+)-Tub.	101 ± 17	o	3
	D_1	D_2	
Ktr.	105 ± 9	91 ± 15	4
(+)-Tub.	109 ± 9	o	3

Ktr. : für die Vagusstimulation mit 3 Hz Werte aus Tab. 1

Ktr. : für die Perfusion mit DMPP $3 \times 10^{-4}M$ Werte aus Tab. 13

(+)-Tub.: (+)-Tubocurarin $10^{-4}M$ während S_2 und D_2 anwesend

12. Änderungen der Herzschlagfrequenz durch K^+108mM , TTX und (+)-Tubocurarin

Während Einwirkung der hohen extrazellulären Kaliumkonzentration verharren die Hühnerherzen in Dauerkontraktur. Dieser Effekt ist schnell reversibel, wenn anschließend die Perfusion mit Tyrodelösung erfolgt.

Auch TTX bewirkt sofort einen Herzstillstand. Während der gesamten Zeit der TTX-Einwirkung ändert sich an diesem Herzstillstand nichts, auch nicht durch Perfusion mit K^+108mM - oder DMPP-haltiger Tyrodelösung. Wird TTX anschließend aus dem Herzen ausgewaschen, fängt das Herz ganz allmählich wieder an, sich rhythmisch zu kontrahieren, bis nach ca. 20 Minuten die ursprüngliche Ruheschlagfrequenz wieder erreicht ist.

Tabelle 12: Einfluß von (+)-Tubocurarin auf die Herzfrequenz

(+) - Tubocurarin			
FR ₁	132 ± 12	FR ₂	144 ± 12
FS ₁	96 ± 18	FS ₂	144 ± 14
FD ₁	53 ± 11	FD ₂	152 ± 16
		n = 3	

Alle Angaben sind in Herzschläge/min ausgedrückt. Gezählt wurde die Herzfrequenz jeweils eine Minute vor Vagusstimulation (FR₁, FR₂) sowie während der ersten 15 Sekunden der Vagusstimulation mit 3 Hz (FS₁, FS₂) und der Perfusion mit DMPP ($3 \times 10^{-4} M$) (FD₁, FD₂).

Die Hühnerherzen wurden 15 Minuten vor S₂ bzw. 22 Minuten vor D₂ mit (+)-Tubocurarin $10^{-4} M$ perfundiert.

Die Ruheschlagfrequenz der Herzen (n = 3) wurde durch Einwirkung von (+)-Tubocurarin nicht signifikant beeinflusst. Weder elektrische Vagusstimulation mit 3 Hz noch Perfusion mit DMPP-haltiger Tyrodelösung konnten während der Einwirkung von (+)-Tubocurarin eine Änderung der Herzschlagfrequenz hervorrufen.

Diese Beobachtungen sind gut mit der Acetylcholinfreisetzung vereinbar. Weder durch elektrische Vagusstimulation noch durch DMPP-Perfusion kann während (+)-Tubocurarin-Einwirkung eine meßbare Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen erzielt werden.

13. Einfluß von Atropin auf die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung

In den vorausgegangenen Experimenten wurden Lokalisation und Eigenschaften der excitatorischen Nikotinrezeptoren untersucht. Nun sollte die Frage geklärt werden, ob auch die durch DMPP ausgelöste Acetylcholinfreisetzung durch Muskarinrezeptoren beeinflusst werden kann. Dazu wurde untersucht, ob Atropin $10^{-6} M$ die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung steigert.

a) ohne Cholinesterasehemmung

DMPP-Kontrollversuche

Die Nervi vagi von Hühnerherzen, welche mit Tyrodelösung ohne Eserin perfundiert wurden, wurden 3mal in Abständen von je 30 Minuten 2 Minuten lang durch DMPP $3 \times 10^{-4}M$ zur Acetylcholinfreisetzung stimuliert. Da während der zweiten Minute keine oder nur eine unter der Ruhefreisetzung liegende Acetylcholinfreisetzung meßbar war (Tab. 9, Abb. 9), wurde zur Berechnung jeweils nur die Freisetzung während der ersten Minute der Perfusion berücksichtigt.

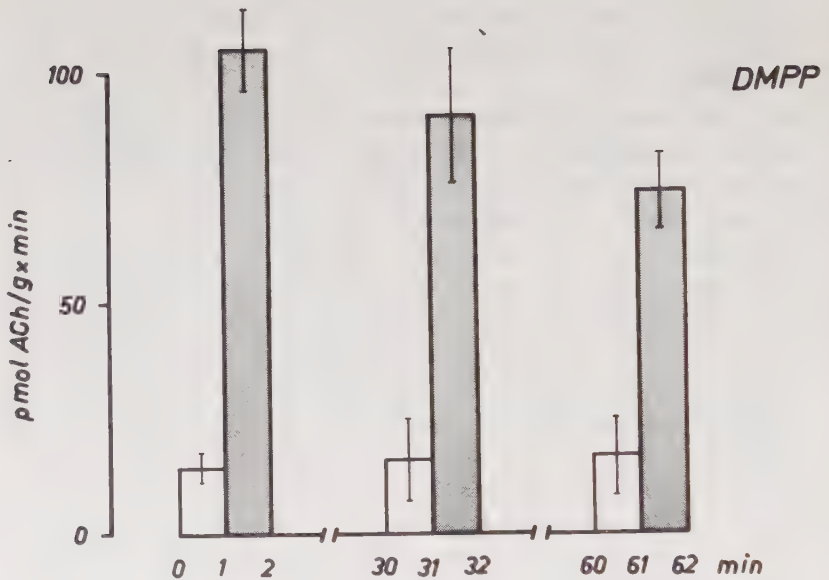
Im Gegensatz zu den Kontrollversuchen mit elektrischer Vagusstimulation, in denen der Reizeffekt praktisch unvermindert reproduzierbar war (Abb. 1), trat in den Versuchen mit DMPP Tachyphylaxie auf. Bei gleicher DMPP-Konzentration wird der Effekt auf die gemessene Acetylcholinfreisetzung von Reizung zu Reizung geringer. Die Ruhefreisetzung bleibt während der ganzen Versuchszeit annähernd gleich (Tab. 13, Abb. 12).

Tabelle 13: Acetylcholinfreisetzung in den Kontrollversuchen mit DMPP ohne Cholinesterasehemmung

Ruhe	DMPP $3 \times 10^{-4}M$	
pmol/g x min		n
$R_1 = 14 \pm 3$	$D_1 = 105 \pm 9$	4
$R_2 = 16 \pm 9$	$D_2 = 91 \pm 15$ $D_2/D_1 = 0,85 \pm 0,09$	4
$R_3 = 17 \pm 9$	$D_3 = 74 \pm 8$ $D_3/D_1 = 0,75 \pm 0,13$	3

Hühnerherzen wurden in Abständen von je 30 Minuten 3mal mit DMPP $3 \times 10^{-4}M$ perfundiert. Gemessen wurde die Acetylcholinfreisetzung jeweils 1 Minute vor (R_1 , R_2 , R_3) und während der ersten Minute der Perfusion mit DMPP-haltiger Tyrodelösung (D_1 , D_2 , D_3).

Abb. 12: Kontrollversuche mit DMPP $3 \times 10^{-4} \text{M}$



Im Abstand von jeweils 30 Minuten wurden Hühnerherzen 3mal mit DMPP $3 \times 10^{-4} \text{M}$ perfundiert. Es wirkte kein Cholinesterasehemmstoff auf die Herzen ein.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Acetylcholinfreisetzung eine Minute vor und während der ersten Minute der Perfusion mit DMPP $\pm \text{S}\bar{\text{x}}$

$n = 4$ während der ersten beiden Stimulationen mit DMPP,

$n = 3$ bei der dritten Stimulation

Einfluß von Atropin $10^{-6}M$

In zwei Versuchen wurde der Einfluß von Atropin $10^{-6}M$ auf die durch DMPP ($3 \times 10^{-4}M$) hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung untersucht. Analog den Versuchen mit elektrischer Vagusstimulation, erfolgte die erste Stimulation durch DMPP unter Kontrollbedingungen, die zweite nach 15-minütiger Vorperfusion mit Atropin. Der Abstand zwischen den zweiminütigen DMPP-Stimulationsperioden betrug wie in den DMPP-Kontrollversuchen 30 Minuten.

Die Ruhefreisetzung war in einem der beiden Versuche nicht meßbar und betrug in dem anderen $R_1 = 28$, $R_2 = 32$ pmol/g x min. Während der ersten Perfusion mit DMPP wurden während der ersten Minute $D_1 = 94$ und 98 pmol/g x min aus den Herzen freigesetzt. In Anwesenheit von Atropin betrug die Acetylcholinfreisetzung durch DMPP $D_2 = 72$ und 76 pmol/g x min.

Atropin bewirkt demnach keine Steigerung der durch DMPP bedingten Acetylcholinfreisetzung in diesen Versuchen ohne Cholinesterasehemmung.

b) mit Cholinesterasehemmung

DMPP-Kontrollversuche

Die Hühnerherzen wurden 15 Minuten vor der ersten Stimulation durch DMPP mit Eserin($10^{-6}M$)-haltiger Tyrodelösung vorperfundiert. Im Abstand von 30 Minuten wurden sie mit DMPP $3 \times 10^{-4}M$ stimuliert.

Die Absolutwerte der gemessenen Acetylcholinfreisetzung betragen $D_1 = 263 \pm 40$ pmol/g x min und $D_2 = 208 \pm 24$ pmol/g x min ($n = 3$), jeweils während der ersten Minute der Perfusion mit DMPP.

Durch den Zusatz des Cholinesterasehemmstoffes Eserin bleibt das Ausmaß der Tachyphylaxie unverändert ($D_2/D_1 = 0,81 \pm 0,04$, $n = 3$).

Einfluß von Atropin $10^{-6}M$

Entsprechend den Kontrollversuchen wurden die Herzen 2mal zwei Minuten lang mit DMPP perfundiert. Die erste Stimulation durch DMPP $3 \times 10^{-4}M$ erfolgte in Anwesenheit von Eserin, die zweite 30 Minuten später nach 15-minütiger Vorperfusion mit Atropin. Die Acetylcholinfreisetzung war $D_1 = 223 \pm 15$ pmol/g x min und $D_2 = 253 \pm 43$ pmol/g x min ($n = 4$) jeweils während der ersten Minute der Perfusion mit DMPP. Während der zweiten Perfusionsminute war in keinem der Versuche eine Acetylcholinfreisetzung meßbar.

Die Steigerung der durch DMPP hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung durch Atropin in Anwesenheit von Eserin ($D_2/D_1 = 1,13 \pm 0,16$, $n = 4$) war im Vergleich mit den DMPP-Kontrollversuchen ($D_2/D_1 = 0,81 \pm 0,04$, $n = 3$) nicht signifikant ($p < 0,2$ im unverbundenen t-Test).

14. Änderungen der Herzschlagfrequenz durch DMPP

a) ohne Cholinesterasehemmung

Auf die Herzfrequenz übt DMPP einen zweifachen Effekt aus: Zunächst wird ein negativ chronotroper Effekt sichtbar, der während der ersten 10 Perfusions-Sekunden maximal ausgeprägt ist. Während der weiteren Perfusion mit DMPP werden die Herzen zunehmend positiv chronotrop beeinflusst. Das Maximum der erhöhten Herzfrequenz wird während der zweiten Perfusionsminute beobachtet unmittelbar vor Beendigung der Perfusion (siehe Abb. 13, oberer Registrierstreifenabschnitt).

Tabelle 14: Änderungen der Herzschlagfrequenz während Perfusion mit DMPP ohne Cholinesterasehemmung

	Schläge/Min		
a Ruhe	130 ± 9		
b 1. - 10. sec. DMPP	50 ± 8	b/a = $0,42 \pm 0,07$	n = 10
c 111. - 120. sec. DMPP	207 ± 9	c/a = $1,66 \pm 0,15$	

Es wurden nur die Frequenzprotokolle von Versuchen verwertet, bei denen DMPP $3 \times 10^{-4} M$ als erster Reiz nach Perfusion mit Tyrodelösung auf das Herz einwirkte (n = 10).

- Gezählt wurde:
- a) die Ruhefrequenz vor DMPP-Perfusion
 - b) die Frequenz während der ersten 10 Sekunden der DMPP-Perfusion
 - c) die maximale Frequenzerhöhung während der 111.-120. Sekunde der DMPP-Perfusion

Die Ruhefrequenz entspricht FR_1 in Tab. 5.

Der negativ chronotrope und der positiv chronotrope Effekt während Perfusion mit DMPP-haltiger Tyrodelösung wurden in jedem Versuch zur Ruhefrequenz des jeweiligen Herzens in Relation gesetzt (b/a, c/a).

Vergleicht man diese Änderungen der Herzschlagfrequenz während DMPP-Perfusion (Tab. 14, Abb. 13) mit dem zugleich gemessenen Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung (Tab. 9, Abb. 9), fällt auf, daß dem maximalen negativ chronotropen Effekt eine maximale Acetylcholinfreisetzung zu Beginn der DMPP-Perfusion entspricht. Es ist anzunehmen, daß die für kurze Zeit zu beobachtende starke Verlangsamung der Herzschlagfrequenz dadurch zustande kommt, daß die anfangs freigesetzte Acetylcholinmenge auf die entsprechenden Rezeptoren des Herzmuskels einwirkt.

Während die Acetylcholinfreisetzung geringer wird, bildet sich der positiv chronotrope Effekt stärker aus. Gegen Ende der Perfusion wird kein Acetylcholin mehr freigesetzt und die Tachykardie erreicht ihr Maximum.

Der positiv chronotrope Effekt des DMPP wird seiner tyraminartigen Wirkung zugeschrieben (ENGEL und LÖFFELHOLZ, 1976). DMPP führt wie Tyramin zu einer Freisetzung von Noradrenalin aus den Endfasern des sympathischen Nervensystems. Noradrenalin stimuliert die β -Rezeptoren des Herzmuskels, woraus die Beschleunigung der Schlagfrequenz resultiert.

Der negativ chronotrope Effekt, der zu Beginn der DMPP-Perfusion beobachtet wird, ist durch Atropin $10^{-6}M$ blockierbar. Die tyraminartige Wirkung dagegen bleibt von Atropin unbeeinflusst.

b) mit Cholinesterasehemmung

Durch Perfusion mit Eserin-haltiger Tyrodelösung wird die Ruhefrequenz der Hühnerherzen verlangsamt. Elektrische Vagusreizung mit 3 Hz bewirkt unter Einwirkung von Eserin nur einen geringen oder keinen zusätzlichen negativ chronotropen Effekt (Tab. 5, Abb. 5).

Ähnliches gilt, wenn die Herzen unter Einwirkung von Eserin mit DMPP $3 \times 10^{-4}M$ perfundiert werden (Abb. 13, mittlerer Registrierstreifen und Tab. 15).

Tabelle 15: Änderungen der Herzfrequenz durch DMPP
mit Cholinesterasehemmung

		Ktr. (n = 3)	Atr. (n = 4)
		Schläge/Min	Schläge/Min
FR ₀		130 ± 8	128 ± 6
FR ₁	a	72 ± 7	73 ± 5
FD ₁	1. - 10.sec. b	61 ± 4	64 ± 3
	111. - 120.sec. c	117 ± 6	156 ± 3
FR ₂	a	71 ± 7	175 ± 9
FD ₂	1. - 10.sec. b	68 ± 1	170 ± 9
	111. - 120.sec. c	86 ± 13	244 ± 24

Die Herzen wurden im Abstand von 30 Minuten je 2 Minuten lang
mit DMPP 3×10^{-4} M perfundiert (D₁, D₂)

Gezählt wurde: a) die Ruheschlagfrequenz während den ersten
10 Sekunden der Minute vor Perfusion mit
DMPP (FR₁, FR₂)
b) die Schlagfrequenz während der ersten 10 Se-
kunden der Perfusion mit DMPP (FD₁, FD₂) und
c) während der letzten 10 Sekunden der zweiminüti-
gen Perfusion mit DMPP (FD₁, FD₂)

Eine Minute vor Beginn der Perfusion mit Eserin-haltiger Tyrode-
lösung wurde die Ausgangsruhefrequenz R₀ gezählt.

Ktr.: Perfusion mit Eserin-haltiger Tyrodelösung

Atr.: 15 Minuten vor und während D₂ Einwirken von Eserin plus
Atropin

Kontrolle

Tyrod



↑ DMPP



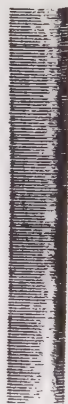
Eserin



↑ DMPP



Eserin
+ Atropin



↑ DMPP



sec

Abb. 13: Herzfrequenzänderungen durch Einwirkung von DMPP

Die Aktionen des rechten Herzventrikels wurden registriert. Abgebildet sind Ausschnitte aus den Registrierstreifen zweier Herzen.

Die obere Abbildung zeigt die Kontraktionen eines Herzens während der ersten Perfusion mit DMPP in einem Kontrollversuch ohne Cholinesterasehemmung.

Die beiden unteren Abbildungen zeigen die Kontraktionen eines Herzens, das während der ersten Einwirkung von DMPP mit Eserin und während der zweiten zusätzlich mit Atropin perfundiert wurde. Zwischen dem Beginn des mittleren und dem Beginn des unteren Registrierstreifenabschnitts sind 30 Minuten vergangen.

Beginn und Ende der jeweils 2-minütigen Perfusion mit DMPP $3 \times 10^{-4} M$ sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Zeitachse zeigt einen Ausschlag pro Sekunde. Sie ist während der 2-minütigen Perfusion mit DMPP konstant unterbrochen dargestellt. Die Papiergeschwindigkeit betrug 2,5 mm/sec.

Der Maßstab am rechten Bildrand entspricht einer Kontraktionskraft von 10g.

IV. DISKUSSION

1. Excitatorische Nikotinrezeptoren

Dimethylphenylpiperazinium (DMPP) gehört zu den Substanzen, die selektiv Nikotinrezeptoren stimulieren. Perfusion des Hühnerherzens mit DMPP-haltiger Tyrodelösung bewirkt eine Acetylcholinfreisetzung mit charakteristischem Zeitverlauf (Tab. 9, Abb. 9). Die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung ist während Einwirkung des Nikotinrezeptorenblockers (+)-Tubocurarin fast vollständig gehemmt. Dies ist ein Hinweis, daß DMPP auch am Hühnerherzen durch Stimulation excitatorischer Nikotinrezeptoren die Transmitterfreisetzung hervorruft.

In der Literatur ist mehrmals beschrieben, daß DMPP eine glockenförmige Dosiswirkungskurve zeigt. Messungen der Kontraktionen des Meerschweinchenileums als Antwort auf Stimulation mit DMPP zeigen eine typisch glockenförmige Dosiswirkungskurve (TRENDLENBURG, 1967). Wenn man am isoliert perfundierten Kaninchenherzen anstatt der Acetylcholinfreisetzung in Abhängigkeit von der DMPP-Konzentration die Noradrenalinfreisetzung aus den adrenergen Nervenendigungen mißt, ergibt sich eine glockenförmige Dosiswirkungskurve (LÖFFELHOLZ, 1970). Die Glockenform bestätigt sich auch, wenn in Anwesenheit von Eserin die Acetylcholinfreisetzung aus dem Meerschweinchenileum in Abhängigkeit von der einwirkenden DMPP-Konzentration betrachtet wird (DZIENISZEWSKI und KILBINGER, 1978).

In all diesen Versuchen nimmt der gemessene Effekt zunächst mit steigender DMPP-Konzentration zu, um dann bei weiterer Steigerung in gleicher Weise wieder geringer zu werden. Die Dosiswirkungskurve (Abb. 8), bei der die Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen in Abhängigkeit von der DMPP-Konzentration gemessen wurde, scheint bei DMPP $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ein Plateau erreicht zu haben. Es war aus methodischen Gründen wegen Interferenz mit der Gaschromatographie nicht möglich, die Wirkung höherer DMPP-Konzentrationen an diesem Versuchs-

präparat zu testen, um so auch den absteigenden Schenkel der Glockenkurve bestätigen zu können. Möglicherweise stellt die in Abb. 8 dargestellte Kurve den aufsteigenden Schenkel einer Glockenkurve dar, denn auch am Hühnerherzen zeigt sich das Phänomen, daß DMPP die Nikotinrezeptoren nach der Stimulation blockiert.

Da DMPP im Gegensatz zu Acetylcholin nicht von der Cholinesterase abgebaut wird, bleibt über längere Zeit eine hohe Konzentration an den Rezeptoren erhalten, und diese bleiben besetzt und sind weiteren Reizen nicht zugänglich. Man erklärt sich die glockenförmige Dosiswirkungskurve so, daß mit steigender Konzentration nicht nur die stimulierenden, sondern auch die blockierenden Effekte zunehmen. Dem entspricht die Beobachtung, daß im aufsteigenden Schenkel der Dosiswirkungskurve die Reizantwort länger dauert, während sie im absteigenden Schenkel kürzer ist, da der zunehmende blockierende Effekt die Stimulationswirkung abkürzt (TRENDLENBURG, 1967).

Die Stimulation der Nikotinrezeptoren des Parasympathikus und deren anschließende Blockade wird am Hühnerherzen ersichtlich aus dem Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung während Perfusion mit DMPP-haltiger Tyrodelösung. Zu Beginn der DMPP-Perfusion wird in etwa soviel Acetylcholin aus dem Hühnerherzen freigesetzt wie während elektrischer Vagusstimulation mit 3 Hz. Dann nimmt die Acetylcholinfreisetzung rapide ab und ist bereits in der zweiten Minute der Perfusion mit DMPP nicht größer als die Ruhefreisetzung (Abb. 9).

Daß der raschen Abnahme der Acetylcholinfreisetzung während Perfusion mit DMPP eine Erschöpfung der Acetylcholinspeicher zugrunde liegt, ist unwahrscheinlich. Werden nämlich während Perfusion mit Tyrodelösung die Nervi vagi mit Stromimpulsen stimuliert, resultiert eine über 5 Minuten gleich hoch bleibende Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen (Abb. 7). Da in der 5. Minute der Nervenstimulation noch genausoviel Acetylcholin freigesetzt wurde wie in der 1. Minute, läßt sich kein Anhalt für eine Speichererschöpfung finden.

Erfolgt eine elektrische Nervenstimulation mit 3 Hz unmittelbar nach 2-minütiger Perfusion der Herzen mit DMPP-haltiger Tyrodelösung, so kann während der gesamten 5-minütigen Nervenstimulation keine Acetylcholinfreisetzung nachgewiesen werden, die signifikant höher ist als während Ruheperfusion (Abb. 10). Dieses Ergebnis muß man wohl dahingehend interpretieren, daß die Nikotinrezeptoren noch mindestens 5 Minuten nach Beendigung der DMPP-Perfusion für die Aufnahme weiterer Reize blockiert sind, so daß eine regelrechte Impulsfortleitung und Transmitterfreisetzung nicht möglich ist. Es handelt sich aber nicht um eine irreversible Schädigung der Nervenstruktur, sondern um eine reversible Rezeptorenblockade (Abb. 10).

Die ganglionäre Umschaltung des Parasympathikus von den präganglionären auf die postganglionären Nervenfasern erfolgt intramural; die Ganglien der Nervi vagi liegen also im Hühnerherzen und werden von den Perfusionslösungen ebenso umspült wie die Nervenenden der postganglionären Fasern. Um die Lokalisation der Nikotinrezeptoren zu klären, wurden Versuche mit Tetrodotoxin (TTX) durchgeführt. TTX hemmt die Fortleitung des Aktionspotentials im Axon durch Blockade des Natrium-Einstroms. Die Acetylcholinfreisetzung aus den Nervenfasernenden aber ist unter TTX-Einwirkung nicht blockiert. Durch Perfusion mit $K^+ 108mM$ -haltiger Tyrodelösung konnte gezeigt werden, daß die Faserendigungen der Nervi vagi von TTX nicht beeinflusst werden, denn die durch hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung wird durch TTX nicht gehemmt (Abb. 11).

DMPP dagegen kann unter Einwirkung von TTX nicht seinen vorher gemessenen Effekt auf die Acetylcholinfreisetzung ausüben (Abb. 11). Die Ursache dafür ist darin zu suchen, daß die excitatorischen Nikotinrezeptoren proximal von der durch TTX blockierten Stelle des Axons, das heißt wahrscheinlich im parasympathischen Ganglion lokalisiert sind.

Die Faserenden der postganglionären parasympathischen Neuronen des Hühnerherzens sind also frei von Nikotinrezeptoren, welche durch DMPP stimuliert werden könnten.

Interessant ist hier der Vergleich zwischen Sympathikus und Parasympathikus des gleichen Organs. Es besteht in beiden vegetativen Nervensystemen eine Übereinstimmung, was die Lokalisation der excitatorischen Nikotinrezeptoren anbetrifft. Sie sind im Ganglion lokalisiert und fehlen am Nervenfasernende. Die Enden der postganglionären sympathischen Nervenfasern des Hühnerherzens enthalten inhibitorische Muskarinrezeptoren und ebenfalls keine excitatorischen Nikotinrezeptoren (ENGEL und LÖFFELHOLZ, 1976).

Ähnliche Ergebnisse wurden an cholinergen Nerven des Meerschweinchenileums gefunden. Werden Längsmuskelstreifen des Meerschweinchenileums, die den Auerbachschen Plexus als Nervenversorgung enthalten, in Tyrodelösung inkubiert, so bewirkt Zusatz von DMPP eine vermehrte Acetylcholinabgabe an die Inkubationslösung. Unter Einwirkung von TTX wird dieser DMPP-Effekt verhindert (VIZI, 1973; DZIENISZEWSKI und KILBINGER, 1978). Die durch Zusatz hoher Kaliumkonzentration bewirkte Acetylcholinfreisetzung dagegen wurde auch bei den Versuchen am Meerschweinchendarm durch TTX nicht beeinflusst (VIZI, 1973).

Diese Experimente am Auerbachschen Plexus des Meerschweinchenileums wurden unter Verwendung Eserin-haltiger Tyrodelösung durchgeführt. Für die TTX-Versuche am Hühnerherzen wurde kein Cholinesterasehemmstoff verwendet. Trotz dieses Unterschiedes sind die Ergebnisse für die verschiedenen Versuchsreihen praktisch identisch. Daraus kann man wohl den Schluß ziehen, daß der Cholinesteraseblocker Eserin auf die beschriebenen Effekte keinen Einfluß nimmt, also weder die DMPP-Einwirkung auf die Nikotinrezeptoren, noch die Blockade der Impulsfortleitung durch TTX wesentlich verändert.

2. Kein Anhalt für excitatorische Muskarinrezeptoren in den parasympathischen Ganglien des Hühnerherzens

In sympathischen Ganglien verschiedener Tierarten konnte muskarinartige Impulsübertragung nachgewiesen werden (TRENDLENBURG, 1967). Auch das elektrophysiologisch gut untersuchte sympathische Ganglion cervicale superius von Säugetieren enthält excitatorische Muskarinrezeptoren, welche wahrscheinlich am Zellkörper des postganglionären Neurons lokalisiert sind (VOLLE und KOELLE, 1975).

An Herz-Lungen-Präparaten von Hunden wurden Versuche durchgeführt, aus deren Ergebnissen folgt, daß sowohl in den sympathischen als auch in den parasympathischen Ganglien des Hundeherzens muskarinartige Erregungsübertragung möglich ist (FLACKE und GILLIS, 1966). Doch konnte die muskarinartige ganglionäre Transmission nur beobachtet werden, wenn der Cholinesterasehemmstoff Eserin auf die Herzen einwirkte. Die Versuche am Hühnerherzen, welche zur Überprüfung des Effektes von (+)-Tubocurarin und zur Untersuchung der durch Reizung mit 3 Hz hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung nach DMPP-Perfusion dienten, wurden ohne Cholinesterasehemmung durchgeführt (Tab. 11). Es lassen sich aus diesen Versuchen keinerlei Anhaltspunkte finden, die dafür sprechen, daß unter physiologischen Bedingungen in den Ganglien der Nervi vagi muskarinartige Transmission stattfindet, welche eine Acetylcholinfreisetzung aus den terminalen Synapsen bewirken könnte.

(+)-Tubocurarin wirkt kompetitiv antagonistisch zu Acetylcholin und nikotinartigen Substanzen auf ganglionäre Nikotinrezeptoren ein. Werden Hühnerherzen mit (+)-Tubocurarinhaltiger Tyrodelösung perfundiert, ist dadurch nicht nur die Acetylcholinfreisetzung durch DMPP aufgehoben. Auch elektrische Nervenstimulation mit 3 Hz führt unter Einwirkung von (+)-Tubocurarin zu keiner meßbaren Acetylcholinfreisetzung (Tab. 11). Die ganglionäre Impulsübertragung scheint nur mit Hilfe funktionsfähiger Nikotinrezeptoren möglich zu sein.

Ginge man von der Annahme aus, im parasymphathischen Ganglion des Hühnerherzens seien außer den excitatorischen Nikotinrezeptoren auch excitatorische Muskarinrezeptoren an der postganglionären Membran lokalisiert, wäre zu erwarten, daß deren Erregung durch Acetylcholin ebenfalls ein Aktionspotential erzeugt, welches durch das postganglionäre Neuron fortgeleitet wird. Dann müßte eine ganglionäre Impulsübertragung durch den Neurotransmitter Acetylcholin auch noch möglich sein, wenn die Nikotinrezeptoren z. B. durch (+)-Tubocurarin oder DMPP spezifisch blockiert sind.

Für die Existenz excitatorischer Muskarinrezeptoren im parasymphathischen Ganglion geben die Experimente am perfundierten Hühnerherzen keinen Hinweis.

3. Änderungen der Herzfrequenz durch Beeinflussung postsynaptischer Muskarinrezeptoren

Werden Hühnerherzen mit Tyrodelösung perfundiert, bewirkt elektrische Vagusstimulation eine Steigerung der Acetylcholinausschüttung (Abb. 1) und zugleich eine sichtbare Verlangsamung der Herzschlagfrequenz (Abb. 5).

Die Vermutung liegt nahe, daß das aus terminalen Fasern des Nervus vagus freigesetzte Acetylcholin mit postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren in Kontakt tritt und so das Herz negativ chronotrop beeinflußt.

Nervenstimulation mit 3 Hz bewirkt eine Senkung der Herzschlagfrequenz auf ca. 60 % der unmittelbar vor der Stimulation gezählten Ruheschlagfrequenz (Abb. 5). Während Nervenstimulation mit 20 Hz schlagen die Herzen nur unwesentlich langsamer als während Stimulation mit 3 Hz, obgleich etwa doppelt soviel Acetylcholin im Perfusat nachweisbar ist (Abb. 1). Diese Beobachtung läßt vermuten, daß bereits durch die geringere Acetylcholinmenge die postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren maximal stimuliert werden, so daß das Herz auch bei Einwirkung größerer Acetylcholinmengen nicht mit weiterer Schlagfrequenzabnahme reagieren kann.

Wird ein Hühnerherz mit Eserin(10^{-6} M)-haltiger Tyrodelösung perfundiert, sinkt die Ruhefrequenz bereits vor einer Vagusstimulation auf etwa 60 % des Ausgangswertes (Abb. 5). Da die Cholinesterase bei dieser Eserin-Konzentration fast vollständig blockiert ist (DIETERICH et al., 1976), kann das bereits während Ruheperfusion freigesetzte Acetylcholin nicht mehr hydrolysiert werden, so daß in der Nähe der postsynaptischen Rezeptoren eine höhere Acetylcholinkonzentration entsteht. Auch die im Perfusat nachweisbare Ruhefreisetzung von Acetylcholin mit Eserin-haltiger Tyrodelösung entspricht größenordnungsmäßig der Acetylcholinmenge während Vagusstimulation mit 3 Hz ohne Cholinesterasehemmung (Tab. 1, Abb. 1). Werden die mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundierten Herzen mit 3 Hz gereizt, resultiert eine gesteigerte Acetylcholinfreisetzung (Abb. 1), aber keine weitere Abnahme der Schlagfrequenz (Abb. 5). Auch DMPP führt in Anwesenheit von Eserin zwar zu einer gesteigerten Acetylcholinfreisetzung, doch zu keiner signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz (Tab. 15, Abb. 13).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man vermuten, daß die postsynaptischen Muskarinrezeptoren bereits durch die Acetylcholinmengen, welche bei Hemmung der Cholinesterase auf die Rezeptoren einwirken, maximal stimuliert sind.

Perfusion der Herzen mit Oxotremorin-haltiger Tyrodelösung führt zu Verlangsamung der Herzschlagfrequenz in Ruhe, obgleich die Acetylcholinfreisetzung unter Oxotremorin-Einfluß keineswegs gesteigert, sondern eher vermindert wird. Die Verlangsamung der Herzfrequenz ist also nicht mit der Einwirkung größerer Acetylcholinmengen auf die postsynaptischen Rezeptoren zu erklären. Der negativ chronotrope Effekt, den Oxotremorin ausübt, beruht wohl auf seinen muskarinartigen Eigenschaften. Oxotremorin tritt demnach mit den postsynaptischen Muskarinrezeptoren in direkten Kontakt und stimuliert diese in ähnlicher Weise wie der Neurotransmitter Acetylcholin. Die Senkung der Herzfrequenz während Ruheperfusion mit Oxotremorin-haltiger Tyrodelösung entspricht ebenfalls der

beobachteten maximalen Stimulationswirkung an den postsynaptischen Muskarinrezeptoren. So ist auch zu erklären, daß Oxtremorin und Eserin zusammen die Herzfrequenz nicht stärker senken als eine der beiden Substanzen allein.

Unter Einfluß von Atropin ist die durch Vagusreizung hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung gleichgroß oder größer als vor Perfusion mit Atropin-haltiger Tyrodelösung. Aber das ausgeschüttete Acetylcholin kann unter Atropin-Einwirkung die Schlagfrequenz des Herzens nicht verlangsamen. Das gilt sowohl für elektrische Vagusstimulation (Abb. 5) als auch für die Nikotinrezeptorenstimulation mit DMPP (Abb. 13). Daher kann man annehmen, daß das Ausbleiben des negativ chronotropen Effektes mit der Blockade der am Herzen lokalisierten Muskarinrezeptoren zu erklären ist.

Auf die Tachykardie, die während DMPP-Perfusion zu beobachten ist, nimmt Atropin keinen Einfluß. Denn der positiv chronotrope Effekt des DMPP ist seiner tyraminartigen Wirkung zuzuschreiben, beruht also auf Noradrenalinfreisetzung (LINDMAR, 1962; ENGEL und LÖFFELHOLZ, 1976).

Vergleicht man die Ruheschlagfrequenz der Hühnerherzen während Perfusion mit Atropin-haltiger Tyrodelösung mit der Ruheschlagfrequenz unmittelbar vor Umschalten auf Atropin, zeigt sich, daß die Herzen unter Atropin-Einfluß bereits in Ruhe schneller schlagen (Tab. 6).

In vivo ist der positiv chronotrope Effekt des Atropin dadurch zu erklären, daß bei Blockade der cholinergen Rezeptoren die sympathische Innervation das Übergewicht gewinnt, da die adrenergen Rezeptoren von Atropin unbeeinflußt bleiben.

Die Herzfrequenzbeschleunigung durch Atropin am Hühnerherzen in vitro beruht wahrscheinlich auf einem anderen Mechanismus: In den meisten Hühnerherzen kommt es schon während Ruheperfusion mit Tyrodelösung zu einer dauernden Acetylcholinfreisetzung. Diese geringen Acetylcholinmengen reichen vermutlich aus, um das spontan schlagende Hühnerherz negativ chronotrop zu beeinflussen. Werden dagegen die Muskarinrezeptoren durch Atropin blockiert, kann das in Ruhe freigesetzte Acetylcholin nicht mehr frequenzsenkend wirken. Daher schlagen die Hühner-

herzen unter Einfluß von Muskarinantagonisten Atropin etwas schneller als in den Kontrollversuchen. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß bereits kleine Acetylcholinmengen an den Muskarinrezeptoren des Herzmuskels wirksam werden.

Auch unter Einwirkung des Cholinesterasehemmers Eserin führt die Perfusion mit Atropin-haltiger Tyrodelösung zur Beschleunigung der Ruhefrequenz.

Die Absolutwerte der Ruheschlagfrequenz mit Eserin plus Atropin entsprechen den Werten während Perfusion mit Atropin-haltiger Tyrodelösung ohne Cholinesterasehemmung, obgleich sich die Ausgangswerte vor Atropin-Zusatz in den beiden Versuchsserien stark unterscheiden (Tab. 5). Während Perfusion mit Eserin-haltiger Tyrodelösung beträgt die Ruhefrequenz nur etwa 60 % der Herzschlagfrequenz, die während Perfusion mit Tyrodelösung ohne Wirkstoff-Zusatz gezählt wurde. Durch Zusatz von Atropin $10^{-6}M$ werden trotz unterschiedlicher Ausgangsbedingungen die gleichen Frequenzwerte erreicht.

Werden die Nervi vagi von Herzen, die mit Eserin und Atropin gleichzeitig perfundiert werden, mit 3 Hz stimuliert, resultiert eine etwa 6mal höhere Acetylcholinfreisetzung als bei gleicher Reizung aus Herzen, die mit Atropin ohne Eserin perfundiert werden (Tab. 4, Abb. 4). Doch in beiden Versuchsserien bleibt die Herzfrequenz von der Vagusstimulation unbeeinflusst (Tab. 6).

Diese Phänomene sind nur erklärbar, wenn man annimmt, daß Atropin eine sehr hohe Affinität zu den postsynaptischen Muskarinrezeptoren besitzt. Die Blockade der postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren durch Atropin $10^{-6}M$ ist so stark, daß sogar Acetylcholinmengen von über 1000 pmol/g x min keinen negativ chronotropen Effekt erzielen können. Dadurch wird verständlich, daß auch unterschiedliche geringere Acetylcholinmengen keinen unterschiedlichen Einfluß auf die Herzschlagfrequenz nehmen können, wenn die postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren durch Atropin fest besetzt sind.

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen, daß sogar mehr als 1000 pmol/g x min keinen Einfluß auf die Herzfrequenz nehmen kann, wenn Atropin auf den Herzmuskel einwirkt, ist anzunehmen, daß neben den durch Atropin blockierbaren Muskarinrezeptoren keine postsynaptischen Nikotinrezeptoren am Hühnerherzen existieren, deren Stimulation durch Acetylcholin die Herzfrequenz beeinflussen könnte.

Präsynaptische und postsynaptische Muskarinrezeptoren an isoliert perfundierten Herzen wurden bereits früher beschrieben (FOZARD und MUSCHOLL, 1972). An isoliert perfundierten Kaninchenherzen wurde die Wirksamkeit verschiedener Muskarinagonisten auf die Noradrenalinfreisetzung, welche durch elektrische Sympathikusreizung oder durch DMPP hervorgerufen wurde, überprüft. Zugleich wurden die Herzaktionen unter Einfluß der verschiedenen Muskarinagonisten registriert. Es zeigte sich, daß die Reihenfolge der Wirksamkeiten der Muskarinagonisten im bezug auf die postsynaptischen Effekte praktisch identisch ist mit der in bezug auf die präsynaptischen Effekte. Dies bedeutet, daß sich die präsynaptischen und postsynaptischen Muskarinrezeptoren in ihren pharmakologischen Eigenschaften nicht unterscheiden (FOZARD und MUSCHOLL, 1972).

4. Inhibitorische Muskarinrezeptoren als Bestandteil des Nervus vagus

a) Oxotremorin-Atropin-Antagonismus

Oxotremorin und Atropin bewirken im bezug auf die Herschlagfrequenz antagonistische Effekte, indem Oxotremorin aufgrund seiner muskarinartigen Wirkung die postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren stimuliert und der Muskarinantagonist Atropin diese Rezeptoren blockiert.

Auch die Acetylcholinfreisetzung aus den Hühnerherzen wird von Oxotremorin und Atropin antagonistisch beeinflußt. Der muskarinartige Agonist Oxotremorin bewirkt eine signifikante Senkung der durch Vagusstimulation hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung (Abb. 6, Abb. 7).

Der Antagonist Atropin dagegen steigert die Acetylcholinfreisetzung auf bis zu 4mal höhere Werte als in den entsprechenden Kontrollversuchen (Abb. 6).

Diese Effekte werden verständlich, wenn man davon ausgeht, daß die Acetylcholinrezeptoren, deren Stimulation durch Oxotremorin eine Senkung und deren Blockade durch Atropin eine Steigerung der Acetylcholinfreisetzung bewirken, inhibitorische Funktionen haben.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse rechtfertigen die Annahme, daß der Parasympathikus des Hühnerherzens inhibitorische Muskarinrezeptoren enthält. Stimulation dieser Muskarinrezeptoren mit Muskarinagonisten bewirkt eine Verminderung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung.

Verminderte Transmitterfreisetzung durch Einwirken muskarinartiger Agonisten wurde auch an sympathischen Nervenendigungen verschiedener Organe beobachtet.

Wenn die präsynaptischen Muskarinrezeptoren sympathischer Nervenfasern stimuliert werden, führt elektrische Sympathikusreizung zu einer signifikant geringeren Noradrenalinfreisetzung als ohne Muskarinagonisten-Einwirkung (Übersicht bei MUSCHOLL, 1979).

Am Kaninchenherzen wurden alle Muskarinagonisten-Effekte, sowohl die Verlangsamung der Herzschlagfrequenz als auch die Reduktion der Noradrenalinfreisetzung durch Atropin aufgehoben (FOZARD und MUSCHOLL, 1972).

Auch die Acetylcholinfreisetzung aus cholinergen Synapsen des ZNS wird durch Muskarinagonisten vermindert.

Der hemmende Effekt der Muskarinagonisten wird durch Atropin verhindert (HADHAZY und SZERB, 1977).

Der Antagonismus zwischen den Muskarinagonisten Oxotremorin und Methacholin und dem Muskarinantagonisten Atropin bezüglich Acetylcholinfreisetzung von der Rattenhirnrinde wurde auch von POLAK (1971) beschrieben.

Die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung aus dem Auerbachschen Plexus des Meerschweinchenileums wird ebenfalls vermindert, indem Oxotremorin auf inhibitorische Muskarinrezeptoren einwirkt. Auch dieser Effekt ist durch Atropin antagonisierbar (KILBINGER, 1977).

Hemmung der reizbedingten Transmitterfreisetzung durch Muskarinagonisten und Antagonisierbarkeit des Effektes durch Atropin ist demnach ein Phänomen, das sowohl im ZNS als auch an peripheren adrenergen und cholinergen Nervenfasern auftritt.

Die maximal erreichte Steigerung der vagusreizbedingten Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen um das 3- bis 4-fache durch die Perfusion mit Atropin stimmt überein mit Literaturwerten, die bei Prüfung des maximalen Atropin-Effektes an anderen Organen, zum Teil in vivo, gefunden wurden.

Eine 3- bis 4-fache Steigerung der Acetylcholinfreisetzung von der Hirnrinde wurde zum Beispiel auch von CELESIA und JASPER (1966) beobachtet. BARTOLINI und PEPEU (1967) erreichten eine ebenso große Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch lokale Applikation des Muskarinantagonisten Scopolamin. Auch die durch Feldreizung hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung aus dem Auerbachschen Plexus des Meerschweinchenileums wird durch Atropin ähnlich stark gesteigert. Wird der Auerbachsche Plexus mit 0,3 Hz stimuliert, steigert Atropin $10^{-6}M$ die Acetylcholinfreisetzung auf maximal das 4,5-fache der Kontrollwerte (KILBINGER, 1977).

b) Einfluß des Cholinesterasehemmstoffs Eserin auf die Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin

Die Versuche am Hühnerherzen zeigen, daß die Steigerung der vagusreizbedingten Acetylcholinfreisetzung durch Atropin von der verwendeten Atropinkonzentration und von der Reizfrequenz geringfügig beeinflusst wird.

Gravierende Unterschiede weisen die Atropin-Effekte auf in Abhängigkeit davon, ob die Hühnerherzen mit oder ohne Cholinesterasehemmung perfundiert werden.

Die Steigerung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen auf das 4-fache der Kontrollwerte durch Atropin konnte nur beobachtet werden, wenn der Cholinesterasehemmstoff Eserin auf die Herzen einwirkte (Abb. 4). Ohne Cholinesterasehemmung bewirkt Atropin keine Steigerung der durch Vagusreizung mit 3 Hz hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen (Abb. 4).

Werden die Nervi vagi ohne Cholinesterasehemmung mit der höheren Reizfrequenz 20 Hz stimuliert, so bewirkt Atropin in den Konzentrationen $10^{-8}M$, $10^{-7}M$ und $10^{-6}M$ eine leichte Steigerung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung auf maximal $150 \pm 15\%$ des Kontrollwertes (Abb. 2). Diese Steigerung ist zwar signifikant, gleicht aber dem Atropin-Effekt, der mit Cholinesterasehemmung zu beobachten ist, nicht annähernd an Stärke.

Wodurch kommen diese gravierenden Unterschiede zustande? Eine Erklärungsmöglichkeit dafür, daß Atropin nur unter Eserin-Einfluß die vagusreizbedingte Acetylcholinfreisetzung stark erhöht, bietet die These, Eserin demaskiere Muskarinrezeptoren.

An Herz-Lungen-Präparaten von Hunden wurde beobachtet, daß der Effekt der präganglionären Vagusstimulation durch Hexamethonium völlig aufgehoben und durch weiteren Zusatz von Eserin teilweise wieder hergestellt werden kann. Dieser erst durch Cholinesterasehemmung ermöglichte neue Effekt der Vagusreizung ist durch geringe Mengen Atropin vollständig blockierbar. Daraus wurde gefolgert, daß in den parasympathischen Nerven des Hundeherzens Muskarinrezeptoren an der ganglionären Transmission beteiligt sind, und daß deren Funktion unter Einwirkung von Cholinesteraseblockern sichtbar wird (FLACKE und GILLIS, 1966).

Elektrophysiologische Experimente in vivo ergaben, daß in sympathischen Ganglien unter Einfluß von Eserin muskarinartige Wege der Erregungsleitung eröffnet werden.

Ohne Cholinesterasehemmung ist die nach Acetylcholininjektion meßbare kurze Antwort der Nerven durch Hexamethonium blockierbar. Mit Cholinesterasehemmung zeigt sich eine davon verschiedene Antwort der Nerven, welche durch Atropin blockierbar ist (TAKESHIGE und VOLLE, 1962).

Nimmt man an, daß Eserin auch am Hühnerherzen eine ähnliche Muskarinrezeptoren-demaskierende Funktion ausübt, wird verständlich, daß Atropin nur unter Eserin-Einwirkung die durch Vagusreiz mit 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung stark erhöhen kann. Denn die Blockade der inhibitorischen Muskarinrezeptoren mit Atropin kann nur dann einen sichtbaren Effekt zeigen, wenn in den entsprechenden Kontrollen ein Inhibitionsmechanismus intakt war.

Wenn dagegen die inhibitorischen Muskarinrezeptoren nicht demaskiert sind und somit auch keine Funktion zeigen, muß auch ihre Blockade durch Atropin wirkungslos bleiben.

Der Demaskierungs-These widerspricht die Beobachtung, daß auch in Abwesenheit von Eserin die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung durch Einwirkungen auf die inhibitorischen Muskarinrezeptoren moduliert werden kann.

Der muskarinartige Agonist Oxotremorin senkt die durch Vagusreizung mit 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung deutlich, sowohl wenn Eserin auf die Herzen einwirkt, als auch unter Versuchsbedingungen ohne Cholinesterasehemmung (Abb. 7). Man kann davon ausgehen, daß Oxotremorin durch Stimulation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren eine hemmende Funktion auf die Acetylcholinfreisetzung ausübt, sowohl mit als auch ohne Cholinesterasehemmung und daß eine Demaskierung der Muskarinrezeptoren an diesem Effekt nicht zu erkennen ist. Daher muß man für den Eserin-Effekt einen anderen Wirkungsmechanismus annehmen.

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Cholin konnte nachgewiesen werden, daß die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung aus der Hirnrinde sowohl durch Oxotremorin als auch durch Eserin vermindert wird. Der Hemmungseffekt beider Substanzen wurde durch Atropin aufgehoben (SZERB und SOMOGYI, 1973).

An den peripheren cholinergen Neuronen des Meerschweinchen-ileums konnte mit Hilfe radioaktiver Markierung festgestellt werden, daß exogenes Acetylcholin die durch elektrische Stimulation hervorgerufene Freisetzung von ^3H - Acetylcholin hemmt. Diese Inhibition war in den Experimenten ohne Cholinesterasehemmung nur gering, während Cholinesterasehemmung mit Eserin 10^{-7}M dagegen stark ausgeprägt (KILBINGER und WESSLER, 1980). Eserin alleine senkte die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung. Die hemmenden Effekte wurden durch Scopolamin antagonisiert, was darauf hinweist, daß es sich um eine Stimulation inhibitorischer Muskarinrezeptoren an den peripheren cholinergen Neuronen handelte (KILBINGER und WESSLER, 1980).

Die Cholinesterase des Hühnerherzens wird durch Eserin 10^{-6}M zu 95 % gehemmt (DIETERICH et al., 1976). Das Acetylcholin, das in den ganglionären Spalt freigesetzt wird, und auch die Acetylcholinmengen, die aus den postganglionären Nervenenden ausgeschüttet werden, können durch die fast vollständige Hemmung der Cholinesterase kaum hydrolysiert werden. Daher ist in Gegenwart von Eserin die Ruhefreisetzung von Acetylcholin mehr als doppelt so hoch im Vergleich zur Ruhefreisetzung ohne Eserin (Abb. 1).

Auch in der Nähe der Acetylcholinrezeptoren herrscht unter Einfluß von Eserin eine höhere Acetylcholinkonzentration. Die inhibitorischen Muskarinrezeptoren werden durch das akkumulierte Acetylcholin stimuliert, und Stimulation dieser Rezeptoren führt, wie auch die Versuche mit Oxotremorin ergaben (Abb. 6), zu einer Hemmung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung.

Daß durch die Einwirkung von Eserin auf das Hühnerherz ein Hemmungsmechanismus aktiviert wird, der eine Verminderung der Acetylcholinfreisetzung hervorruft, wird aus den Meßergebnissen zunächst nicht ersichtlich. Denn in den vorliegenden Versuchen wurde der "overflow" von Acetylcholin aus dem Hühnerherzen im Perfusat bestimmt, welcher nicht mit der absoluten Freisetzung aus den Acetylcholinspeichern übereinstimmt.

Ohne Cholinesterasehemmung wird das aus den Acetylcholin-speichern freigesetzte Acetylcholin schnell hydrolysiert, so daß in den Perfusatproben ein geringer overflow gemessen wird. Mit Cholinesterasehemmung kann das freigesetzte Acetylcholin nicht hydrolysiert werden. Wenn auch die Freisetzung durch Stimulation des Hemmungsmechanismus vermindert ist, bleibt unter Eserin-Einwirkung in den Perfusatproben mehr Acetylcholin nachweisbar als in den entsprechenden Kontrollen ohne Eserin.

Wird der Eserin-haltigen Tyrodelösung Atropin zugesetzt, dann behält Eserin gleichbleibende Funktion in bezug auf die Cholinesterasehemmung, aber die inhibitorischen Muskarinrezeptoren können nicht weiter durch akkumuliertes Acetylcholin stimuliert werden, da sie durch Atropin blockiert sind. Daraus resultiert eine 3- bis 4-fache Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit Eserin.

Die Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen hängt wohl hauptsächlich davon ab, wie intensiv die inhibitorischen Muskarinrezeptoren vor Atropin-Einwirkung stimuliert werden. Je stärker diese inhibitorischen Muskarinrezeptoren während der Kontrollreizungen durch Acetylcholin stimuliert werden, umso deutlicher wird der Atropin-Effekt.

Während die Nervi vagi ohne Cholinesterasehemmung mit 3 Hz stimuliert werden, ist wahrscheinlich kein Hemmungsmechanismus aktiviert. Daher kann auch die Blockade der inhibitorischen Muskarinrezeptoren durch Atropin keinen Effekt zeigen, der von den Kontrollen verschieden ist.

Während Nervenstimulation mit 20 Hz bewirken die auf die inhibitorischen Muskarinrezeptoren einwirkenden Acetylcholinmengen eine Aktivierung des Hemmungsmechanismus. Als Ausdruck des Hemmungsmechanismus kann man es auch deuten, daß die pro Stimulus freigesetzte Acetylcholinmenge bei der Vagusstimulation mit höherer Reizfrequenz kleiner wird. Durch Stimulation mit 20 Hz wird etwa doppelt soviel Acetylcholin pro Zeiteinheit aus den Hühnerherzen freigesetzt als durch Stimulation mit 3 Hz (Abb. 1).

Blockade der Muskarinrezeptoren durch Atropin und somit Unterbrechung des Hemmungsmechanismus bewirkt während Vagusreizung mit 20 Hz eine gegenüber den Kontrollen auf ca. 150 % gesteigerte Acetylcholinfreisetzung (Abb. 4). Diese Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin ist wesentlich geringer als die während Stimulation mit 3 Hz in Anwesenheit von Eserin beobachtete Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch Atropin, obwohl die meßbare Acetylcholinfreisetzung in den Kontrollversuchen unter beiden Versuchsbedingungen etwa gleich hoch war (Abb. 4).

Die Cholinesterasehemmung selbst als Ursache für die unterschiedliche Ausprägung des Atropin-Effektes wurde bereits ausführlich erläutert. Doch sollte in diesem Zusammenhang auch bedacht werden, daß Nervenreizung mit 20 Hz schlechter zu beeinflussen ist als Nervenreizung mit 3 Hz. Alle Modulatoren scheinen umso weniger wirksam zu sein, je höher die Reizfrequenz ist. Bei hochfrequenter Reizung vermindert die intraneuronale Calciumakkumulation die Effekte von Substanzen, die den Calciumeinstrom modifizieren. Doch diese Erklärung ist hypothetisch (STARKE, 1977).

Atropin senkte die Ruhefreisetzung von Acetylcholin aus Herzen, welche mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundiert wurden. Die Senkung der Acetylcholinfreisetzung kann bei hohen Atropinkonzentrationen durch einen lokalanästhetischen Effekt zustandekommen, was aber bei der Konzentration 10^{-6} M Atropin eher unwahrscheinlich ist, so daß es zur Zeit keine einleuchtende Erklärung für das Phänomen gibt.

Oxotremorin bewirkt am mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundiertem Hühnerherzen keine Senkung der Ruhefreisetzung. Die Ruhefreisetzung von Acetylcholin aus dem Meerschweinchenileum dagegen wird durch Oxotremorin gesenkt (KILBINGER und WAGNER, 1975). Vielleicht spielt dabei die andere Lokalisation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren eine Rolle (siehe nächsten Abschnitt der Diskussion).

c) Lokalisation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren

Es bleiben im wesentlichen zwei Möglichkeiten zu diskutieren, wo die inhibitorischen Muskarinrezeptoren lokalisiert sein könnten:

1. am Faserende des postganglionären Neurons, also an der terminalen Synapse des Nervus vagus
2. im parasympathischen Ganglion.

Um Hinweise auf die Lokalisation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren zu bekommen, wurde untersucht, ob Atropin die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung steigert.

DMPP führt zu Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen, indem es die wahrscheinlich im parasympathischen Ganglion lokalisierten Nikotinrezeptoren stimuliert. Ginge man von der Hypothese aus, daß die inhibitorischen Muskarinrezeptoren am Ort der Acetylcholinfreisetzung am Faserende lokalisiert sind, so wäre zu erwarten, daß bei Blockade dieser Rezeptoren durch Atropin die Acetylcholinfreisetzung während Perfusion mit DMPP-haltiger Tyrodelösung gesteigert wird.

Die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung wird unter Atropin-Einwirkung nicht gesteigert, wenn die Herzen ohne Cholinesterasehemmung perfundiert werden.

Diese Beobachtung alleine spricht noch nicht gegen die Annahme, daß die inhibitorischen Muskarinrezeptoren am Faserende lokalisiert sind. Denn das Ausbleiben des Atropin-Effektes kann mit den gleichen Argumenten erklärt werden wie die Beobachtung, daß die durch 3 Hz-Vagusreizung hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung ohne Cholinesterasehemmung von Atropin unbeeinflusst bleibt (siehe Teil 4b der Diskussion).

Werden die Hühnerherzen mit Eserin-haltiger Tyrodelösung perfundiert, so ist die Acetylcholinfreisetzung als Antwort auf Vagusstimulation mit 3 Hz unter Atropin-Einfluß auf das 4-fache erhöht. Die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung dagegen wird auch mit Cholinesterasehemmung nur leicht erhöht, aber nicht signifikant gesteigert.

Dies könnte auf dem andersartigen Freisetzungsmechanismus beruhen. Bereits aus dem Zeitverlauf der Acetylcholinfreisetzung werden Unterschiede ersichtlich. Es resultiert aus der Stimulation der Nikotinrezeptoren mit DMPP keine gleichmäßige Acetylcholinfreisetzung, die während der gesamten Stimulationszeit durch Atropin moduliert werden kann, wie dies bei elektrischer Vagusstimulation der Fall ist. Möglicherweise ist die DMPP-bedingte Acetylcholinfreisetzung schwerer zu beeinflussen.

Auch am Sympathikus wurde beobachtet, daß die durch DMPP hervorgerufene Transmitterfreisetzung schlechter modulierbar ist als die durch elektrische Nervenstimulation hervorgerufene. Durch α - Rezeptoren-Agonisten und -Antagonisten ist die durch elektrische Stimulation der sympathischen Nerven hervorgerufene Noradrenalinfreisetzung gut beeinflussbar, die durch DMPP hervorgerufene dagegen schlecht (STARKE, 1977).

Unter der Annahme der Arbeitshypothese, daß die am isoliert perfundierten Hühnerherzen gefundenen inhibitorischen Muskarinrezeptoren an den Faserendigungen der postganglionären parasympathischen Neurone lokalisiert sind, könnte man die Senkung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung durch Oxtremorin und durch akkumuliertes Acetylcholin mit der Stimulation eines negativen Feedback-Mechanismus und die Steigerung durch Atropin mit der "Disinhibition" im Sinne POLAKS (1971) erklären, der präsynaptische Muskarinrezeptoren an cholinergen Synapsen des ZNS beschrieb.

Lokalisation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren an den Faserendigungen des Nervus vagus des Hühnerherzens würde auch eine weitere Übereinstimmung mit den Strukturen der sympathischen Nervenendigungen des gleichen Organs bedeuten. Die terminalen Synapsen des Sympathikus des Hühnerherzens sind frei von Nikotinrezeptoren und besitzen inhibitorische Muskarinrezeptoren (ENGEL und LÖFFELHOLZ, 1976).

Andererseits hemmen muskarinartige Agonisten durch Stimulation inhibitorischer Muskarinrezeptoren an den sympathischen Nervenenden sowohl die durch elektrische Sympathikusstimulation hervorgerufene Noradrenalinfreisetzung als auch die durch DMPP oder durch KCl hervorgerufene Noradrenalinfreisetzung (Übersicht MUSCHOLL, 1979).

Experimente am Auerbachschen Plexus des Meerschweinchenileums ergaben, daß auch an peripheren cholinergen Synapsen inhibitorische Muskarinrezeptoren an der Stelle der Acetylcholinfreisetzung, also an der präsynaptischen Membran, lokalisiert sind (DZIENISZEWSKI und KILBINGER, 1978).

Am Meerschweinchenileum wird nicht nur die durch elektrische Stimulation hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung durch Atropin gesteigert und durch Oxotremorin gehemmt (KILBINGER, 1977). Die durch DMPP bewirkte Acetylcholinfreisetzung aus dem Meerschweinchenileum wird ebenfalls durch Atropin gesteigert und durch Oxotremorin gehemmt (DZIENISZEWSKI und KILBINGER, 1978). Einen deutlichen Hinweis auf die Lokalisation inhibitorischer Muskarinrezeptoren an der Stelle der Acetylcholinfreisetzung, also am Faserende, gibt die Steigerung der durch hohe Kaliumkonzentrationen hervorgerufenen Acetylcholinfreisetzung durch Atropin (DZIENISZEWSKI und KILBINGER, 1978).

Die Experimente am isoliert-perfundierten Hühnerherzen erbrachten andere Ergebnisse. Nur die durch elektrische Vagusstimulation hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung wird durch Atropin gesteigert. Dagegen zeigt Atropin am Hühnerherzen keine signifikante Steigerung der Acetylcholinfreisetzung durch DMPP, auch nicht, wenn die Cholinesterase durch Eserin 10^{-6} M fast vollständig blockiert ist. Auch die durch hohe Kaliumkonzentrationen hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen bleibt von Atropin unbeeinflusst sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Eserin (KILBINGER und WAGNER, 1979).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Faserendigungen der Nervi vagi am Hühnerherzen nicht mit inhibitorischen Muskarinrezeptoren ausgestattet sind. Es ist vielmehr anzunehmen, daß die inhibitorischen Muskarinrezeptoren im Nervus vagus des Hühnerherzens nicht distal von den Nikotinrezeptoren lokalisiert sind, an denen DMPP eine Stimulation bewirkt. So ist als Lokalisation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren wahrscheinlich das parasympathische Ganglion anzunehmen. Die elektrische Vagusstimulation erfolgte präganglionär. Die Impulse mußten die parasympathischen Ganglien passieren, um eine Acetylcholinfreisetzung aus den Vesikeln der Faserendigungen bewirken zu können. Daher ist die Acetylcholinfreisetzung, welche durch elektrische Stimulation hervorgerufen wird, durch ganglionäre Muskarinrezeptoren modulierbar im Gegensatz zur K^+ -bedingten Acetylcholinfreisetzung, welche unabhängig von ganglionärer Erregungsfortleitung (Abb 12) durch Depolarisation der Faserendigungen hervorgerufen wird.

Ob im parasympathischen Ganglion Interneurone an der Erregungsübertragung und Erregungsbahnung beteiligt sind, konnte bisher nicht geklärt werden. Daher können Theorien, welche auf der Lokalisation der inhibitorischen Muskarinrezeptoren an Interneuronen oder an präganglionären Fasern basieren, zwar mit den Versuchsergebnissen übereinstimmen, würden aber reine Spekulationen darstellen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

An nach Langendorff perfundierten Hühnerherzen wurden Änderungen der Acetylcholinfreisetzung und der Herzfrequenz gemessen, während die Nervi vagi mit supramaximalen Stromimpulsen (3 Hz oder 20 Hz) oder mit DMPP stimuliert wurden. Die Wirkungen von Atropin auf die Acetylcholinfreisetzung aus dem Herzen und auf die Herzfrequenz wurden sowohl in Abwesenheit als auch während Einwirkung von 10^{-6} M Eserin untersucht.

Die Herzfrequenz wurde durch Atropin gegenüber den jeweiligen Kontrollen beschleunigt, was mit der Blockade postsynaptischer Muskarinrezeptoren durch Atropin erklärt wird.

Die Steigerung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung durch Atropin ist abhängig vom Reizmodus (3 Hz, 20 Hz, DMPP) und nach Cholinesterasehemmung am stärksten ausgeprägt.

Die Steigerung der reizbedingten Acetylcholinfreisetzung durch Atropin wurde durch Oxotremorin antagonisiert. Oxotremorin senkte die durch Vagusstimulation mit 3 Hz hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung signifikant sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Eserin.

Aufgrund des ermittelten Oxotremorin-Atropin-Antagonismus wird angenommen, daß die Acetylcholinfreisetzung aus dem Hühnerherzen durch inhibitorische Muskarinrezeptoren im Nervus vagus moduliert wird.

Eserin führte durch Akkumulation endogenen Acetylcholins zur Stimulation dieser inhibitorischen Muskarinrezeptoren, wodurch die reizbedingte Acetylcholinfreisetzung gehemmt wurde. Atropin unterbrach durch Blockade der inhibitorischen Muskarinrezeptoren den Hemmungsmechanismus und bewirkte damit eine gegenüber den Kontrollversuchen bis auf das 4-fache gesteigerte Acetylcholinfreisetzung.

Perfusion des Hühnerherzens mit DMPP führte zu einer Acetylcholinfreisetzung durch Stimulation excitatorischer Nikotinrezeptoren, welche durch (+)-Tubocurarin blockierbar sind.

Diese Nikotinrezeptoren sind wahrscheinlich in den parasympathischen Ganglien lokalisiert. TTX hemmte vollständig die durch DMPP bedingte Acetylcholinfreisetzung.

Die durch DMPP hervorgerufene Acetylcholinfreisetzung wurde von Atropin nicht signifikant gesteigert.

Die inhibitorischen Muskarinrezeptoren sind wahrscheinlich nicht an den Nervenfasernenden, sondern eher in den parasympathischen Ganglien lokalisiert.

VI. LITERATUR

BARTOLINI, A. und PEPEU, G.:

Investigations into the acetylcholine output from the cerebral cortex of the cat in the presence of hyoscine.

Brit. J. Pharmacol. Chemother. 31, S.66 - 73 (1967)

CELESIA, G.G. und JASPER, H.H.: Acetylcholine released from cerebral cortex in relation to state of activation.

Neurol. (Minn.) 16, S.1053 - 1064 (1966)

CHEN, G., PORTMAN, R. und WICKEL, A.:

Pharmacology of 1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium iodide, a ganglion-stimulating agent.

J.Pharmacol.exp.Ther. 103, S.330 - 336 (1951)

DIETERICH, H.A., KAFFEI, H., KILBINGER, H. und LÖFFELHOLZ, K.:

The effects of physostigmine on cholinesterase activity, storage and release of acetylcholine in the isolated chicken heart.

J.Pharmacol.exp.Therap. 199, S.236 - 245 (1976)

DZIENISZEWSKI P. und KILBINGER, H.:

Muscarinic modulation of acetylcholine release evoked by dimethylphenylpiperazinium and high potassium from guinea-pig myenteric plexus.

European J. Pharmacol. 50, S.385 - 391 (1978)

ENGEL, U. und LÖFFELHOLZ, K.:

Presence of muscarinic inhibitory and absence of nicotinic excitatory receptors at the terminal sympathetic nerves of chicken hearts.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 295, S.225 - 230 (1976).

FLACKE, W. und GILLIS R.A.:

Muscarinic ganglionic transmission

Pharmacologist 8, S.3 (1966)

FOZARD, J.R. und MUSCHOLL, E.:

Effects of several muscarinic agonists on cardiac performance and the release of noradrenaline from sympathetic nerves of the perfused rabbit heart.

Brit.J. Pharmacol. 45, S.616 - 629 (1972)

HADHAZY und SZERB, J.C.:

The effect of cholinergic drugs on ^3H -acetylcholine release from slices of rat hippocampus, striatum and cortex. Brain Research 123, S.311 - 322 (1977)

KILBINGER, H.:

Gas chromatographic estimation of acetylcholine in the rabbit heart using a nitrogen selective detector.

Journal of Neurochemistry 21, S.421 - 429 (1973)

KILBINGER, H.:

Formation and release of acetylpyrrolidiniumcholine (N-methyl, N-acetoxyethylpyrrolidinium) as a false cholinergic transmitter in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296, S.153 - 158 (1977)

KILBINGER, H.:

Modulation by oxotremorine and atropine of acetylcholine release evoked by electrical stimulation of the myenteric plexus of the guinea-pig ileum.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300, S.145 - 151 (1977)

KILBINGER, H. und LÖFFELHOLZ, K.:

The isolated perfused chicken heart as a tool for studying acetylcholine output in the absence of cholinesterase inhibition.

Journal of Neural Transmission 38, S.9 - 14 (1976)

KILBINGER, H. und WAGNER, B.:

The role of presynaptic muscarine receptors in regulating acetylcholine release from peripheral cholinergic neurones.

Presynaptic Receptors (eds LANGER S.Z., STARKE, K. und DUBOCOVICH, M.L.) S.347 - 351 Pergamon Press, Oxford (1979)

KILBINGER, H. und WAGNER, P.:

Inhibition by oxotremorine of acetylcholine resting release from guinea-pig ileum longitudinal muscle strips

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287, 47 - 60 (1975)

KILBINGER, H. und WESSLER, J.:

Inhibition by acetylcholine of the stimulation-evoked release of ^3H acetylcholine from the guinea-pig myenteric plexus
Neuroscience 5, 1331 - 1340 (1980)

LINDMAR, R.:

Die Wirkung von 1,1-Dimethyl-4-phenyl-piperazinium-jodid am isolierten Vorhof im Vergleich zur Tyramin- und Nikotinwirkung

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 242, S.458 - 466 (1962)

MUSCHOLL, E.:

Presynaptic muscarine receptors and inhibition of release.

The Release of Catecholamines from Adrenergic Neurons

(ed. D.M. Paton) S. 87 - 110, Pergamon Press Oxford and New York (1979)

PEPEU, G.:

The release of acetylcholine from the brain.

Progress in Neurobiology (G.A. Kerkutt und J.W. Phillis)

Volume 2, Part. 4, S.257 - 288, Oxford Pergamon Press (1973)

POLAK, R.L.:

Stimulating action of atropine on the release of acetylcholine by rat cerebral cortex in vitro.

Brit. J. Pharmacol. 41, S.600 - 606 (1971)

STARKE, K.:

Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems.

Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol. 77, S.1 - 124 (1977)

SZERB, J.C. und SOMOGYI, G.T.:

Depression of acetylcholine release from cerebral cortical slices by cholinesterase inhibition and by oxotremorine.

Nature New Biol.(London) 241, S.121 - 122 (1973)

TAKESHIGE, C. und VOLLE, R.L.:

Bimodal response of sympathetic ganglia to acetylcholine following eserine or repetitive preganglionic stimulation.

J.Pharmacol. exp.Ther. 138, S.66 - 73 (1962)

TAKESHIGE, C. und VOLLE, R.L.:

A comparison of the ganglion potentials and block produced by acetylcholine and tetramethylammonium.

Brit.J.Pharmacol. 23, S.80 - 89 (1964)

TRENDELENBURG, U.:

Some aspects of the pharmacology of autonomic ganglion cells.

Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie 59, S.1 - 85 (1967)

VIZI, E.S.:

Acetylcholine release from guinea-pig ileum by parasympathetic ganglion stimulants and gastrin-like polypeptides.

Brit.J.Pharmacol. 47, S.765 - 777 (1973)

VOLLE, R.L. und KOELLE, G.B.:

Ganglionic stimulating and blocking agents.

The Pharmacological Basis of Therapeutics (L.L.Goodman und A.Gilman) 5. Auflage, S.565 - 574 (1975)

Herrn Prof. Dr. Heinz Kilbinger
möchte ich besonders danken für
die Themenstellung und seine
freundliche Unterstützung bei der
Durchführung der Arbeit.

VII. LEBENSLAUF

Am 3. Mai 1955 wurde ich, Claudia Krieg, in Heidelberg geboren als das erste von zwei Kindern des Versicherungskaufmanns Helmut Krieg und seiner Ehefrau Katharina Luise Krieg geborene Breiter.

Nach den vier Grundschuljahren (1962 - 1966) in Offenbach besuchte ich den humanistischen Zweig des Offenbacher Leibnizgymnasiums. Dort legte ich im Mai 1974 die Reifeprüfung ab.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im Oktober 1974 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Im August 1976 bestand ich das Physikum und ein Jahr später den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Nach dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung befand ich mich von April 1980 bis April 1981 im Praktischen Jahr am akademischen Lehrkrankenhaus in Kaiserslautern. Nach dem Staatsexamen erhielt ich im Mai 1981 die Approbation.

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit habe ich von September 1977 bis August 1978 im Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

